

Monozentrische Auswertung eines molekularen Schnelltests zur Detektion von Mikroorganismen bei Patienten mit Verdacht auf Pneumonie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

**vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Stephanie Juretzek

geboren am 05. Oktober 1989 in Spremberg

Gutachter:

1. Prof. Dr.med. Eberhard Straube, Uniklinikum Jena
2. Prof. Dr.med. Mathias Pletz, Uniklinikum Jena
3. Prof. Dr.med. Enno Jacobs, Technische Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung : 08.12.2015

Meinem Freund und meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

allg.	allgemein
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
ca.	<i>lat.</i> circa, ungefähr, schätzungsweise
CAP	<i>engl.</i> Community - acquired Pneumonia, ambulant erworbene Pneumonie
CCD	Charge - Coupled Device
COPD	<i>engl.</i> Chronic Obstructive Lung Disease, chronische obstruktive Lungenerkrankung
CRO	<i>engl.</i> Clinical Research Organisation, Auftragsforschungsinstitut
CRP	C - reaktives Protein
d	<i>engl.</i> day, Tag
DHPS	Dihydropteroat - Synthase
diast.	diastolisch
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonuclein acid, Desoxyribonukleinsäure
eCRF	electronic case report form
ESBL	Extended Spectrum Beta - Lactamase
et al.	<i>lat.</i> et alii, und andere
FP	falsch positiv
FN	falsch negativ
Gen.	Generation
Gpt/l	<i>Einheit:</i> Gigaparts pro Liter
HAP	<i>engl.</i> Hospital - Acquired Pneumonia, nosokomiale Pneumonie
HIV	Humane Immundefizienz - Virus
HWZ	Halbwertszeit
ITS	Intensivstation

i.v.	intravenös
Major	<i>engl.</i> , Haupt -
MDR	<i>engl.</i> Multidrug Resistance, Mehrfachresistenz gegen Arzneimittel
Minor	<i>engl.</i> , Neben -
MRSA	Methicillin - resistenter Staphylococcus aureus
MTLA	medizinisch technische/r Laborassistent/in
n. a.	<i>engl. not analysed</i> , nicht analysiert
overtreatment	<i>engl.</i> , Überbehandlung
PBP	Penicillinbindungsprotein
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PCT	Procalcitonin
PE	Plattenepithel
RP	richtig positiv
RN	richtig negativ
s.	siehe
STIKO	ständige Impfkommision des Robert Koch Instituts
syst.	systolisch
t	<i>engl.</i> time, Zeit
TBC	Tuberkulose
UKJ	Universitätsklinikum Jena
VAP	<i>engl.</i> Ventilator - associated Pneumonia, beatmungsassoziierte Pneumonie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	9
2.1 Pathophysiologie der Pneumonie	10
2.1.1 Lobärpneumonie	10
2.1.2 Interstitielle Pneumonie	10
2.2 Epidemiologie der Pneumonie	11
2.3 Erregerspektrum der Pneumonie	12
2.4 Diagnostische Score-Systeme zur Abschätzung der Schwere einer Pneumonie	13
2.5 Therapie der Pneumonie	15
2.6 Diagnostik der Pneumonie	19
3 Ziel der Arbeit	20
3.1 Ermittlung von Sensitivität und Spezifität der Methode	20
3.2 Relevanz der mittels PCR nachgewiesenen Pathogene und Einfluss dieser Ergebnisse auf die Therapie	20
3.3 Bearbeitungszeit der Proben bis zum Ergebnis	20
3.4 Vergleich der gemessenen Antibiotikaresistenz mit den nachgewiesenen Resistenzgenen	20
3.5 Ökonomische Betrachtung	21
4 Methodik	22
4.1 Studiendesign	22
4.2 Studienprotokoll	22
4.3 Ethik	24
4.4 Statistische Verfahren	24

4.5	Laborverfahren	25
4.5.1	Prototyp der Unyvero® Pneumonia Application	25
4.5.2	Das konventionelle Verfahren in der Mikrobiologie des UKJ	30
5	Ergebnisse	33
5.1	Auswertung der Performanz des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen	33
5.1.1	Patienten und Proben.....	33
5.1.2	Praxistauglichkeit des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen	34
5.1.3	Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW	36
5.2	Ergebnisse der klinische Auswertung.....	44
5.2.1	Patienten und Proben.....	44
5.2.2	Auswertung der Laborparameter.....	46
6	Diskussion	49
7	Schlussfolgerung	55
8	Literatur-/Quellenverzeichnis.....	56
9	Anhang	62
9.1	Danksagung	64
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	65

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit geht es um die regionale Validierung des neu entwickelten Unyvero[®] Pneumonia Application Prototyps und seiner Praxistauglichkeit in Jena, sowie seiner Bedeutung für den Alltag. Es handelt sich hierbei um eine lokale Teilauswertung für Jena von der größeren europäischen Studie an den Zentren in Tübingen, Bochum/Bad Oeynhausen, Brüssel und Barcelona mit beteiligt waren.

Beim Unyvero[®] Pneumonia Application Prototyp handelt es sich um einen Automaten, der mittels Multiplex-PCR 17 Pneumonie-verursachende Pathogene und 22 ihrer Resistenzgene in einem Arbeitsansatz analysiert. Die Reaktionen laufen dabei als Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in acht Einzelkammern einer Probenkassette ab. Die vorgesehenen Proben stammen aus den Atemwegen (BAL: bronchoalveoläre Lavage, Sputum, Trachealsekret). Der Automat soll in der Diagnostik des Krankenhaus für Pneumonie eingesetzt werden. Bislang gibt es nur wenige kommerzielle Angebote für molekulare Schnelltests zum Nachweis von Erregern für dieses Krankheitsbild, die eine frühzeitige Diagnostik und konsekutive Therapieeinleitung beschleunigen könnten, um somit die Letalität der Pneumonie zu senken.

Im Rahmen der europäischen Validierungsstudie wurden in Jena 302 Patienten mit dem Verdacht auf eine Pneumonie pseudonymisiert und prospektiv mit dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen analysiert und mit dem derzeitigen Goldstandard, der kulturellen Anzucht, verglichen.

207 Patientenproben aus Jena wurden letztlich in die Auswertung eingeschlossen. Unter den eingeschlossenen Proben konnten nur 60% der Analysen verwertet werden, da es aufgrund von Hard- und Softwarefehlern zu Ausfällen in einzelnen Analysen kam. Daher wurde der Prototyp während des Einschlussverfahrens mehrfach repariert und auch gewechselt.

In der Auswertung ist eine Bearbeitungszeit von etwa sechs Stunden festgestellt worden. Die konventionelle mikrobiologische Analyse dauerte im Schnitt vier Tage. Ebenso konnte eine Spezifität von 96,5% und eine Sensitivität von 62,8% erreicht werden. Dabei war das Ergebnis stark abhängig vom Pathogen. Während *Klebsiella pneumoniae* und *Serratia marcescens* einen PPW von 100% hatten, gab es Schwierigkeiten bei der korrekten Identifizierung von *Streptococcus pneumoniae* (PPW=3%).

Beachtet man das ein Großteil der Patienten (ca. 40%) bereits antibiotisch behandelt waren zum Testzeitpunkt, lassen sich die Ergebnisse insgesamt deutlich verbessern

(Sensitivität=76,4%; Spezifität=98,3%). Es ist jedoch nicht klar, ob der detektierte Keim tatsächlich für das Antibiotikum sensibel war und deshalb kulturell nicht mehr gewachsen ist. Eine Wiederholung der Studie an unbehandelten Patienten mit Verdacht auf Pneumonie ist zu empfehlen um den Einfluss der Antibiotika auf das Testergebnis zu bewerten.

Die Auswertung der Resistenzgene war aufgrund der hohen Ausfallsrate (45%) und teils fehlender Plausibilität nicht möglich.

Im Rahmen der klinischen Analyse wurden von 73 Patienten der Intensivstation Krankenakten zur Bewertung des klinischen Bildes herangezogen, um die Relevanz der Ergebnisse des Unyvero® Pneumonia Application Prototyps für die Therapie zu validieren.

Es konnte im klinischen Bild ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Pneumonie und denen ohne Pneumonie in der Höhe ihrer Leukozytenwerte festgestellt werden ($p=0,03$). Pneumonieklienten hatten signifikant höhere Leukozytenwerte als der Rest der analysierten Patienten. Weiter konnten Unterschiede zwischen Pneumonieklienten und der restlichen Studienpopulation im PCT-Wert und dem CRP-Verlauf gefunden werden.

Es zeigte sich, dass 64% der Patienten ($n=50$) zum Testzeitpunkt bereits ein Antibiotikum erhielten. 39 dieser Patienten waren kalkuliert mit einer ausreichenden Antibiotikatherapie versorgt. Da es nicht möglich war die PCR-Analysen der Resistenzgene zu verwerten, ist keine Aussage möglich, ob es zur Verbesserung der Antibiotikatherapie mit dem Prototypen der Unyvero® Pneumonia Application käme. Sicher scheint allerdings, dass mit der kalkulierten Therapie ein Großteil der Patienten schon adäquat behandelt war.

Eine Entwicklung wie der Prototyp der Unyvero® Pneumonia Application hat durchaus seine Vorzüge, vor allem was Geschwindigkeit der Erregernachweise, der Grad der Automatisierung und die Spezifität der Erregernachweise angeht. Auf dem analysierten Entwicklungsstand ist das Gerät aber noch nicht praxistauglich. Die Ausfallraten des Prototyps waren zu hoch, ebenso die vorgesehenen Kosten pro Analyse. Die PCR für *Streptococcus pneumoniae* und die Resistenzanalyse müssen verbessert werden.

Die Erwartungen an einen PCR-Automat zum schnellen Nachweis von Erregern respiratorischer Infektionen bei Patienten einer Intensivtherapiestation sind hinsichtlich Genauigkeit, Schnelligkeit und Kosten sehr hoch. Das Keimspektrum der Probenkassette sollte eventuell mit relevante Pilze (z.B. *Aspergillus sp.*) oder Viren (z.B. CMV, Influenza) (Braun 2014) ergänzt werden.

2 Einleitung

Die Pneumonie ist auch heute noch eine ernstzunehmende Infektionskrankheit und Platz 10 der Gründe für den Tod eines Menschen in Deutschland. Allein im Jahr 2012 wurde laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes bei 17.761 Menschen eine Pneumonie als Todesursache angegeben (DESTATIS 2014). Pneumoniefälle, die in eine Sepsis mündeten, Tumorkranken, deren Lebensende durch eine Pneumonie bestimmt war, und viele Patienten, die zu Hause an einer akuten Pneumonie starben, sind vermutlich in dieser Zahl nicht enthalten.

Während es z.B. bei der Sepsis schon mehrere molekulare Methoden zur Detektion der Erreger gibt (Bauer und Reinhart 2010), greift man bei der mikrobiologischen Diagnostik einer Lungenentzündung immer noch auf die klassische kulturelle Anzucht der auslösenden Mikroorganismen zurück. Bislang ist das eine zeitraubende Methode mit einigen diagnostischen Lücken und Schwierigkeiten. So wurde in einer Studie von 2009 an 17.340 Patienten gezeigt, dass nur bei 7,6% der Patienten, die einer ambulant erworbenen Pneumonie hatten, eine mikrobiologische Diagnostik durchgeführt wurde (Bartlett 2011, Bartlett 2013). Die Gründe dafür sind einerseits, dass die Labore heutzutage häufig nicht die nötige Nähe zum Patientenbett haben. Es werden immer länger Transportwege zum Labor und damit Zeit bis zum Analysebeginn nötig. Ein weiterer Punkt ist, dass durch retrospektive Analysen Leitlinien zur Therapie entwickelt wurden, die meist schon eine adäquate Therapie der Infektion auch ohne Erregernachweis möglich machen. Die Entwicklung eines molekularen Schnelltests, der vor allem die Hürden der Transportwege überwindet, wäre eine gewinnbringende Innovation für den Patienten und das Gesundheitssystem und könnte dazu führen, dass der Keimnachweis in die Leitlinien aufgenommen wird (Nolte 2008).

Die Hoffnung liegt darin frühzeitig sowohl der klassischen auch bei atypischen Pneumonien eine adäquate und gezielte Therapie möglich zu machen und somit ernsthafte Komplikationen zu vermeiden, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und ihre Liege- oder Behandlungsdauer zu verkürzen (Dalhoff et al. 2012).

Des Weiteren könnte durch einen zeitigen Erregernachweis und seiner Antibiotikaresistenzen eine spezifische Therapie erfolgen und somit die Entstehung von Resistenzen und Nebenwirkungen der Antibiotika eingedämmt werden.

2.1 Pathophysiologie der Pneumonie

Die Pneumonie ist eine Entzündung der tiefen Atemwege und befällt das Lungenparenchym. Sie wird zu 90% bakteriell verursacht und kann akut und chronisch verlaufen. Es lassen sich einige Einteilungen in der Literatur finden. Sie haben ihren Nutzen für die Therapie oder die Risikoabschätzung.

2.1.1 Lobärpneumonie

Die Lobärpneumonie ist meist klassisch bakteriell durch bekannte Erreger wie Pneumokokken und Staphylokokken. Sie betrifft dem Namen nach vorwiegend die Lungenlappen.

Der Patient klagt über plötzlich anfangenden Husten, Atemnot so wie häufig atemabhängigen Schmerzen in der Brust und farbigen eitrigen Auswurf (Bartlett 2013, Braun 2014). Aufgrund der Entzündung zeigen sich röntgenologisch Verschattungen in den Lungenlappen und gegebenenfalls Pleuraergüsse.

2.1.2 Interstitielle Pneumonie

Die interstitielle (atypische) Pneumonie ist häufig viraler Genese. Aber auch Bakterien, wie Mykoplasmen, Coxiellen, Legionellen und Chlamydien oder auch der den Pilzen nahestehende *Pneumocystis jirovicii* können eine atypische Pneumonie verursachen (Schack et al. 2013, Braun 2014). Der Auswurf ist meist farblos und klar. Atemnot und Husten treten nur gering bzw. schleichend auf (Bartlett 2013). Die Besonderheit der atypischen Pneumonie besteht darin, dass sie wegen der meist hilusnahen Lokalisation weder durch Auskultation noch durch Perkussion, sondern nur durch das Röntgenbild nachgewiesen werden kann. Weitere klinische Zeichen der interstitiellen Pneumonie sind Kopf- und Gliederschmerzen sowie ein Leistungsknick, den die Patienten häufig angeben (Braun 2014).

Zwischen den beiden beschriebenen Formen ist die Bronchopneumonie anzusiedeln, welche vor allem durch exazerbierte Bronchitiden entsteht.

2.2 Epidemiologie der Pneumonie

Die Pneumonie ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten. An ihr erkranken jährlich schätzungsweise 400.000 - 680.000 Menschen in Deutschland (Hoffken et al. 2009, Schnoor et al. 2007). Dabei müssen 30 % der Patienten stationär behandelt werden. Etwa 3% der ambulant erworbene Pneumonien müssen sogar intensivstationär weiterbetreut werden (Pletz et al. 2012).

Grundsätzlich prädisponiert sind alte Menschen und Kinder, da deren Immunsystem entweder geschwächt oder noch nicht vollständig ausgereift ist. Aufgrund dieser Tatsache empfiehlt die STIKO des Robert-Koch-Instituts für Kleinkinder und Menschen ab 60 Jahren die Pneumokokkenimpfung (STIKO 2013, Höffken 2012). Für Kinder wird die Impfung gegen folgende pneumonierelevante Erreger empfohlen: *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* Typ B, *Streptococcus pneumoniae* und das Masernvirus. Dazu werden die Säuglinge und Kleinkinder wiederholt im Alter von zwei, drei, vier und 11-14 Monaten geimpft. Bis zum Ende des vierten Lebensjahres ist es möglich eine verpasste Impfung nachzuholen (STIKO 2013).

Aber auch nicht infektiöse Umstände erzeugen eine Disposition für eine Pneumonie, so z.B. Aspiration, Intubation oder Herzinsuffizienz mit resultierender Lungenstauung.

Als klassische Risikopatienten für Pneumonien gelten Patienten mit einer schweren Grunderkrankung oder einer Erkrankung im Bereich der Lungen (Braun 2014). Sie bieten entweder einen guten Lebensraum für Erreger oder eine schlechte Abwehr gegen diese. Dazu zählen vor allem die COPD und Mukoviszidose, aber auch Veränderungen des Lungenparenchyms wie z.B. bei Lungenemphysem oder Bronchiektasen (Braun 2014). In beiden Fällen ist der körpereigene Abwehrmechanismus, die mukoziliäre Clearance, gestört und die Erreger können schlechter aus den Atemwegen entfernt werden. Es kommt zur Vermehrung der Erreger. Bei unzureichender Eliminierung durch Makrophagen und das Immunsystem kann sich so eine Pneumonie ausbilden. Häufig werden diese Patienten über lange Zeit antibiotisch therapiert und sind mit höher resistenten Keimen besiedelt, z.B. bei Mukoviszidose (Braun 2014).

Eine weitere Risikogruppe stellen immunsupprimierte Patienten dar (Signe et al. 2012), wie Patienten mit einer immunsuppressiven Therapie im Rahmen einer Transplantation oder einer

Chemotherapie. Aber auch immunkonsumierende Infektionen und Erkrankungen wie AIDS führen zu einer schlechteren Immunabwehr und damit verbunden zum vermehrten Auftreten einer Pneumonie (Braun 2014, Pletz et al. 2012). Die Patienten weisen häufig einen schwereren Verlauf ihrer Pneumonie auf und werden gerade mit selten Erregern wie CMV, Pneumocystis (Gruyter 2007) oder anderen Pilzen infiziert (Braun 2014).

2.3 Erregerspektrum der Pneumonie

Im ambulanten Sektor kommt vor allem *Streptococcus pneumoniae* (38-40%) und *Haemophilus influenzae* (13%) (Podbielski 2010, Welte und Kohnlein 2009) als Erreger vor. Die Bedeutung von *Chlamydia pneumoniae* als Pathogen der ambulanten Pneumonie scheint lange überschätzt worden zu sein. Neuere Daten zeigten, dass *Chlamydia pneumoniae* nur etwa in 0,9% der Pneumonien auftritt und dann vor allem bei jüngeren Patienten (Wellinghausen et al. 2006, Höffken 2012). Nosokomiale Pneumonien werden dagegen primär durch Enterobakterien (34,6%), *Staphylococcus aureus* (20,1%) und *Pseudomonas spp.* (18,2%) verursacht (Podbielski 2010). Auffallend ist, dass ambulante Patienten, die stationär behandelt werden müssen neben Pneumokokken häufig mit *Legionella spp.* infiziert sind. Insgesamt lassen sich bei etwa 12% der hospitalisierten Patienten Legionellen nachweisen (Podbielski 2010).

Das Erregerspektrum lässt sich mit der folgenden Einteilung der Pneumonien abschätzen. Dazu gehört die ambulant erworbene Pneumonie (CAP) und die nosokomiale Pneumonie (HAP). Bei einer CAP ist *Streptococcus pneumoniae* mit 40% der meist gefundene Erreger (Welte und Kohnlein 2009). Die nosokomiale Pneumonie wird vorrangig von *Staphylococcus aureus* und Enterobakterien verursacht (Podbielski 2010). Als nosokomiale Pneumonie bezeichnet man eine 48 Stunden nach Aufnahme ins Krankenhaus auftretende Pneumonie, deren Ursprung nicht auf eine vor dem stationären Aufenthalt erworbene Infektion zurückzuführen ist (Podbielski 2010).

Eine dritte Gruppe stellt die beatmungsassoziierte Pneumonie (VAP) dar. Als solche wird eine Pneumonie bezeichnet, die nach einer Beatmungszeit von 48 Stunden auftritt. Diese Pneumonieform wird durch Pneumonieerreger wie *Haemophilus spp.*, Pneumokokken und

Pseudomonas aeruginosa verursacht. Allerdings spielen auch schwer therapierbare Keime wie MRSA oder ESBL-bildende Enterobakterien zunehmend eine Rolle (Podbielski 2010). Für die Entstehung einer VAP scheint die Hospitalisierungszeit von Bedeutung zu sein. Bei mehr als fünf Tagen steigt die Wahrscheinlichkeit der Infektion mit multiresistenten bzw. potentiell multiresistenten Erregern. Liegt die Hospitalisierungszeit dagegen bei weniger als fünf Tagen kommen meist klassische Pneumonieerreger als Pathogen vor (Podbielski 2010). Des Weiteren werden Pneumonien anhand ihres Verlaufes in typische (Lobärpneumonie) und atypische (interstitielle) Pneumonie unterteilt.

Während der Patient bei einer typischen Lobärpneumonie durch Entzündungszeichen wie Fieber, Leukozytose und erhöhte CRP-Werten auffällt, verläuft eine atypische interstitielle Pneumonie häufig unspezifisch und infektiologisch mäßig auffallend (Dietel M 2013). Auch bei dieser Einteilung findet man ein unterschiedliches Keimspektrum, Mykoplasmen, Chlamydien und Legionellen seien hier genannt. Besonders im Falle der Chlamydien sollte in der Anamnese nach Tieren im Haushalt gefragt werden.

2.4 Diagnostische Score-Systeme zur Abschätzung der Schwere einer Pneumonie

Mit einer durchschnittlichen Letalität von 13,72-14,44 % bei stationären Patienten ist die Pneumonie eine Infektion, die einer schnellen und sicheren Diagnostik bedarf, um die Letalität zu verringern (Dalhoff et al. 2012, Welte et al. 2006).

Ein wegweisender Score ist der CRB-65-Score (Ewig et al. 2009). Er beinhaltet den Bewusstseinszustand, die Atemfrequenz, den Blutdruck und das Alter des Patienten. Anhand des Schemas in Tab.1 kann in jeder Kategorie ein Punkt vergeben werden.

Tab. 1: Parameter des CRB-65-Score

		Erklärung	Bewertung
C	confusion	Verwirrtheit	ja / nein 1 / 0
R	respiratory rate	Atemfrequenz ≥ 30 / min	ja / nein 1 / 0
B	blood pressure	Blutdruck syst. < 90 mmHg, diast. < 60 mmHg	ja / nein 1 / 0
65		Alter ≥ 65 Jahre	ja / nein 1 / 0

Mithilfe dieses Scores kann wie in Tab. 2 beschrieben eine Abschätzung zur Letalität (L) des Patienten erfolgen.

Tab. 2: Letalitätsabschätzung anhand des CRB-65-Score

Punkte	Letalität in %
0	2,4
1 - 2	13,43
3 - 4	34,39

Eine Erweiterung des CRB-65-Scores ist der CURB-65-Score, der den Serumharnstoffspiegel mit einbezieht. Dieses Score-System erlaubt abzuschätzen, ob ein Patient ambulant versorgt werden kann (0 Punkte) oder eine stationäre Betreuung erforderlich ist (Rello 2008). Beide Tests sind praxistauglich. Da der CRB-65-Score jedoch leichter zu erheben ist und ohne invasive Methoden wie die Blutentnahme für den Serumharnstoffwert auskommt, ist er zu empfehlen (Bauer et al. 2006).

Ein weiteres Score-System ist der modifizierte ATS-Score. Er dient der Einschätzung, ob ein Patient mit CAP intensivmedizinisch betreut werden muss oder nicht (Braun 2014).

Der modifizierte ATS-Score berücksichtigt die in Tab. 3 aufgeführten Major und Minor Kriterien (Höffken 2012).

Tab. 3: Kriterien des modifizierten ATS-Score

Major Kriterien	Intubation
	Dauer der Katecholaminbehandlung
Minor Kriterien	respiratorische Insuffizienz
	systolischer Blutdruck
	Infiltrate in der Röntgen-Thorax Aufnahme

Ist kein Major Kriterium erfüllt und maximal zwei Minor Kriterien kann der Patient auf der peripheren Station weiter betreut werden. Erfüllt der Patient allerdings ein Major Kriterium oder alle Minor Kriterien ist die Behandlung auf der Intensivstation indiziert (Braun 2014).

2.5 Therapie der Pneumonie

Die Therapie der Pneumonie ist umfangreich und richtet sich vor allem nach dem verursachenden Erreger. Da der Erreger nur in einem kleinen Anteil der Pneumonien nachgewiesen werden kann (Bartlett 2011, Woodhead 1998, Pletz et al. 2012, Musher et al. 2013) und die Diagnostik der analysierten Proben einige Tage dauern kann, muss eine Pneumonie durch eine initial kalkulierte Therapie behandelt werden. Selbst unter optimalen Bedingungen lassen sich lediglich die Hälfte aller Pneumonieerreger identifizieren (Pletz et al. 2012, Dietel M 2013). Es ist daher von großer Hilfe, die oben beschriebene Unterteilung in CAP und HAP zu machen, um das zu erwartende Keimspektrum einzuschränken.

Bei einer CAP bieten sich Antibiotika mit einem breiten Spektrum und einer langen Halbwertszeit (HWZ) an. Sie werden in akzeptablen Einnahmeschemata verabreicht und verbessern somit die Compliance des Patienten und die Sicherheit der Therapie. Infrage kommende Substanzen sind Amoxicillin oder Cephalosporine der 3. Generation. Sie können oral appliziert werden und bekämpfen sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien (Pletz et al. 2012). Bei Verdacht auf eine Zoonose oder andere atypische Pneumonien sollte eine Kombination mit einem Makrolid als Therapie erfolgen.

In der stationären Therapie spielt die Kombination aus β -Laktam Antibiotika und β -Lactamase Inhibitoren eine große Rolle. Sie erfasst auch resistente Pneumokokken und *H. influenzae*, nicht aber atypische Pneumonieerreger (Ruß A. 2011). Weshalb es heutzutage gerade in der USA eine Therapieempfehlung für die Kombination aus Ceftriaxon und einem Makrolid-Antibiotikum gibt (Brodt H.R. 2012, Ruß A. 2011).

Die deutschen Leitlinien für eine CAP empfehlen Aminopenicilline bei Patienten, die keinerlei Risikofaktoren aufweisen (Dalhoff et al. 2012). Bei Risikopatienten sollte jedoch eine Kombination aus Aminopenicillin und β -Lactamaseinhibitor, z.B. Ampicillin und Sulbactam, angewendet werden um ein möglichst breites Erregerspektrum abzudecken (Pletz

et al. 2012). Zu den Risikofaktoren zählen Komorbidität und das Alter des Patienten. Eine Zusammenfassung der Antibiotika befindet sich in Tab. 4 und Tab. 5.

Nach zwei Tagen sollte jede Therapie auf ihre Wirksamkeit geprüft werden um Therapieversager schnell zu erkennen und zu intervenieren (Braun 2014, Pletz et al. 2012). Dafür eignen sich klinische Parameter wie das Befinden des Patienten und seine Körpertemperatur oder das Antibiotogramm und Laborwerte wie CRP und PCT.

Die antibiotische Therapie sollte bei einer CAP mindestens fünf Tage andauern und frühestens 48 Stunden nach Abklingen der Infektionszeichen (z.B. Fieber) beendet werden (Dalhoff et al. 2012).

Im Gegensatz dazu sollte eine HAP acht Tage behandelt werden (Dalhoff et al. 2012). Bei der Initialtherapie einer HAP muss außerdem beachtet werden, ob der Patient schon eine Antibiose erhält oder nicht. Ist der Patient bereits antibiotisch vorbehandelt sollte die Therapie umgestellt werden und darauf geachtet werden, dass vorhandene Lücken mit der neuen Antibiose abgedeckt sind.

Wie oben bereits erwähnt muss bei der HAP auch mit multiresistenten und seltenen Pneumonieerregern gerechnet werden. In diesem Fall wird Piperacillin in Kombination mit Tazobactam oder Ceftazidim empfohlen (Pletz et al. 2012). Wobei initial zusätzlich noch Aminoglykoside oder Pseudomonas-wirksame Fluorchinolone wie z.B. Ciprofloxacin eingesetzt werden sollten. Ceftazidim sollte nicht als Monotherapie verwendet werden (Dalhoff et al. 2012).

Bei der beatmungsassoziierten Pneumonie (VAP) sollte immer an Pseudomonaden gedacht werden und von der Antibiose mit erfasst sein. Es bietet sich Ceftazidim und Meropenem an, welche häufig in Kombination mit Pseudomonas-wirksamen Fluorchinolonen gegeben werden (Ruß A. 2011, Torres et al. 2010).

Bei Vorliegen eines Antibiotogramms und der Erregerdiagnose sollte die Therapie reevaluiert werden und entsprechend der Resistenzlage angepasst werden. Als Therapiekontrolle dienen neben dem klinischen Erscheinungsbild, Infektionsparameter wie Fieber, CRP und Leukozyten.

Tab. 4: Primärtherapie einer ambulant erworbener Pneumonie

	Risikogruppe	Mittel der Wahl	Dosierung
ambulant	< 65 Jahre allg. gesunde Patienten unkompliziert	Amoxicillin	> 70 kg: 3 x 1 g ¹ < 70 kg: 3 x 0,75 mg ¹
	> 65 Jahre Risikofaktoren Komorbiditäten	Amoxicillin/Clavulansäure Sultamicillin	2 x 875/125 mg ¹ 2 x 750 mg ¹
Normalstation	<i>Initial min. 2 d i.v.</i>	Amoxicillin/Clavulansäure Ampicillin/Sulbactam Cefuroxim Ceftriaxon Cefotaxim Ertapenem ³ +/- Makrolid	3 x 2,2 g ² 3 x 3 g ² 3 x 1,5 g ² 1 x 2 g ² 3 x 2g ² 1 x 1g ²
Intensivstation		Piperacillin/Tazobactam Ceftriaxon Cefotaxim Ertapenem ³ + Makrolid	3 x 4,5 g ² 1 x 2 g ² 3 x 2g ² 1 x 1g ²
	Pseudomonas - Risiko	Piperacillin/Tazobactam i.v. Cefepim Imipenem Meropenem + Levo-/Ciprofloxacin ⁴	3-4 x 4,5 g ² 3 x 2 g ² 3 x 1 g ² 3 x 1 g ² 2 x 500 mg ² , 3 x 400 mg ²
¹ per os ² intravenös ³ bei Risiko für Enterobakterien inklusive ESBL (kein Pseudomonas!!!) ⁴ Bei Ansprechen deeskalieren auf Betalaktam/Makrolid oder Flurochinolon			

modifiziert nach (Pletz et al. 2012)

Tab. 5: Alternativtherapie einer ambulant erworbenen Pneumonie

	Risikogruppe	Alternativtherapie	Dosierung
ambulant	< 65 Jahre allg. gesunde Patienten unkompliziert	Azithromycin Clarithromycin Roxythromycin Doxycyclin	1 x 500 mg ¹ (3 d) 2 x 500 mg ¹ 1 x 300 mg ¹ Initial: 1 x 200 mg ¹ > 70 kg: 1 x 200 mg ¹ < 70 kg: 1 x 100 mg ¹
	> 65 Jahre Risikofaktoren Komorbiditäten	Levofloxacin Moxifloxacin	2 x 500 mg ¹ 1 x 400 mg ¹
Normalstation	<i>Initial min. 2 d i.v.</i>	Levofloxacin Moxifloxacin	2 x 500 mg ² 1 x 400 mg ²
Intensivstation		Levofloxacin Moxifloxacin	2 x 500 mg ² 1 x 400 mg ²
	Pseudomonas - Risiko	Piperacillin/Tazobactam i.v. Cefepim Imipenem Meropenem + Aminoglykosid ³ + Makrolid	3-4 x 4,5 g ² 3 x 2 g ² 3 x 1 g ² 3 x 1 g ²
¹ per os ² intravenös ³ Bei Ansprechen deeskalieren auf Betalaktam/Makrolid oder Flurochinolon, Aminoglykoside sollten nicht länger als 3d verwendet werden			

modifiziert nach (Podbielski 2010, Pletz et al. 2012)

2.6 Diagnostik der Pneumonie

Eine Pneumonie lässt sich aufgrund ihrer großen Variation nicht allein durch das klinische Erscheinungsbild diagnostizieren. Symptome wie Auswurf, Fieber oder Tachypnoe können auch andere Ursachen haben (Metlay et al. 1997, Metlay und Fine 2003). Mittels einer Röntgen-Thorax Aufnahme in zwei Ebenen und einem Pathogennachweis aus den unteren Atemwegen lässt sich die Diagnose allerdings sichern und von anderen respiratorischen Erkrankungen abgrenzen (Gennis et al. 1989, Mandell et al. 2007).

Laut den aktuellen Leitlinien soll bei der CAP nur anhand einer Röntgen-Thorax Untersuchung entschieden werden, wie die Behandlung erfolgt. Ein Keimnachweis ist nicht nötig.

Erst bei hospitalisierten Patienten mit dem Verdacht auf Pneumonie wird auch ein Erregernachweis durchgeführt. Hierfür verwendet man zur Kultivierung von Bakterien oder Pilzen nicht selektive und selektive Nährmedien. Zum Erregernachweis steht für einige Mikroorganismen die PCR zur Verfügung. Zum orientierenden Erregernachweis sollte grundsätzlich die Mikroskopie der respiratorischen Probe durchgeführt werden. Dies dient außerdem der Qualitätssicherung der Probe. Als Probenmaterial wird die bronchoalveoläre Lavage (BAL), das Sputum und das Trachealsekret verwendet.

Es ist ersichtlich, dass die Pneumonie ein weites Feld umfasst, auf dem dringend eine Weiterentwicklung der Diagnostik nötig ist um die Therapie zu optimieren. Curetis ist eine der Firmen, die eine Möglichkeit zum komplexen und automatisierten molekularen Erregernachweis aus Atemwegsmaterialien entwickelt hat. Der simultane Nachweis von 17 verschiedenen Erregern und 22 Resistenzgenen in kürzester Zeit wäre eine Innovation in der Diagnostik der Pneumonie, welche eine enorme Zeitersparnis und somit Verbesserung der Therapie mit sich bringt. Ähnliche Automaten konnten für die Sepsisdiagnostik bereits in den Laboralltag integriert werden. (Laakso et al. 2011)

3 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit hat die Aufgabe, folgende fünf Ziele zu erarbeiten.

3.1 Ermittlung von Sensitivität und Spezifität der Methode

Das primäre Ziel war eine monozentrische Auswertung der Ergebnisse der Multiplex-PCR, der an sich multizentrischen, prospektiven, nicht randomisierten Validierungsstudie des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototyps. Im Rahmen dieser Arbeit werden monozentrisch für Jena die Sensitivität und Spezifität mit dem jetzigen Goldstandard, Kultur und Resistogramm, verglichen.

3.2 Relevanz der mittels PCR nachgewiesenen Pathogene und Einfluss dieser Ergebnisse auf die Therapie

Als Zweites wurden klinische und paraklinische Daten der Patienten aus den Krankenunterlagen ermittelt und zusammen mit dem radiologischen Befund entschieden, ob eine Pneumonie vorliegt oder nicht. Damit sollte gezeigt werden, ob die detektierten Mikroorganismen von pathologischer und therapeutischer Relevanz waren und Einfluss auf die Therapie hatten oder hätten haben sollen.

3.3 Bearbeitungszeit der Proben bis zum Ergebnis

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Auswertung der Bearbeitungszeit. Die Frage ist, ob schneller ein gleichwertiges Ergebnis gefunden werden kann und somit schneller eine adäquate Therapie stattfinden kann.

3.4 Vergleich der gemessenen Antibiotikaresistenz mit den nachgewiesenen Resistenzgenen

Anhand der vorliegenden Daten sollte verglichen werden, ob genotypisch nachgewiesenen Resistenzen auch phänotypisch ausgeprägt waren.

3.5 Ökonomische Betrachtung

Die letzte Fragestellung umfasst die Ökonomie der neuen Technik.

Es wurde bewertet, ob die neue Technik aufgrund ihrer Schnelligkeit, Genauigkeit und geringen Personalbindung günstiger als die konventionelle Methode ist und der hohe Preis der Analysen vor dem Hintergrund rechtzeitig verfügbarer Ergebnisse für Therapieentscheidungen gerechtfertigt ist.

4 Methodik

4.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie "Detection of Pneumonia associated Pathogens and Antibiotic Resistance Genes using the Curetis Unyvero[®] Pneumonia Application" Prototyp" war eine prospektive, nicht randomisierte, nicht interventionelle, multizentrische Studie.

Die daran beteiligten Zentren waren mikrobiologische Institute in Tübingen, Bochum/Bad Oeynhausen, Brüssel, Jena und ein Institut für klinische Infektiologie in Barcelona.

Es wurde der Vergleich zwischen der konventionellen mikrobiologischen Untersuchung von Atemwegsmaterialien und der Analyse mit dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen gemacht.

In dieser Arbeit geht es um die monozentrische Auswertung der Ergebnisse aus Jena.

4.2 Studienprotokoll

Von März 2012 bis September 2012 wurden Atemwegsmaterialien von Patienten, die mindestens 18 Jahre alt waren und Zeichen eines Infekts der tiefen Atemwege aufzeigten, eingeschlossen. Alle Proben stammten von Patienten, die stationär aufgenommen waren und somit nicht ambulant an der jeweiligen Klinik behandelt wurden. Dabei war nicht entscheidend, ob die Patienten auf Intensivstation oder Normalstation betreut wurden. Entscheidend war, dass von der Originalprobe für die konventionelle, mikrobiologische Routinediagnostik mindestens 1 ml übrig blieb um ausreichend Material für den Vergleich mit der neuen Methode zu haben.

Ausgeschlossen wurden Proben, die innerhalb eines Zeitraumes von fünf Tagen schon einmal vom Prototypen der Unyvero[®] Pneumonia Application getestet wurden, eine Lagerungszeit von mehr als 18 Stunden hatten oder von Patienten stammten, die eine Tuberkulose (TBC) hatten.

Des Weiteren wurden Proben ausgeschlossen, die nicht zur konventionellen mikrobiologischen Analyse verwendet werden konnten oder bei denen die Analyse durch den Unyvero® Pneumonia Application Prototypen nicht am selben Tag durchgeführt werden konnte.

Für die weiterführenden Betrachtungen im Hinblick auf den Einfluss der Ergebnisse der Multiplex-PCR auf die klinischen Entscheidungen oder die Plausibilität der Ergebnisse angesichts der Krankheitsverläufe wurden nur intensivpflichtige Patienten ausgewertet, welche keine Mukoviszidose hatten (n = 73, 78 Proben). Diese wurden anhand des klinischen Bildes bewertet, ob ein Infekt und ob speziell eine Pneumonie vorlag.

Hilfreich dafür war die Auswertung der Verläufe der Laborparameter CRP, PCT, Leukozyten sowie BGA und Laktat. Außerdem wurde bei jedem Patienten das vom Thorax angefertigte Röntgenbild zur Beurteilung mitverwendet und erneut mit fachlicher Unterstützung von Fr. Dr. med. Judith Peiselt, Hr. Dr. med. Peter Keller und Hr. Dr. med. Matthias Karrasch ausgewertet. Anhand der Patientenakten konnte der tägliche Verlauf der Vitalparameter analysiert werden und mit der angesetzten Therapie in Zusammenhang gebracht werden. Einen Gesamtüberblick des Krankheitsgeschehens war in den Arztbriefen einsehbar.

Akzeptierte Atemwegsmaterialien waren die BAL, Sputum oder Trachealsekret. Die Materialien wurden vor Beginn der Analyse gedrittelt: eine Probe wurde für die mikrobiologische Routinediagnostik verwendet, die zweite Probe wurde in pseudonymisierter Form dem Unyvero® Pneumonia Application Prototypen zugeführt und die dritte Probe wurde bei -20°C für möglicherweise notwendige Kontrolluntersuchungen eingefroren. Die Ergebnisse des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen wurden aus ethischen Gründen nicht zur Behandlung oder zur Diagnosestellung verwendet und dem behandelnden Arzt nicht mitgeteilt. Das betreuende Personal wurde von der Firma Curetis oder dem Auftragsforschungsinstitut (CRO: Clinical Research Organization) im Bezug auf die anstehenden Analysen mit dem Unyvero® Pneumonia Application Prototypen ausgebildet und überprüft.

4.3 Ethik

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und bewilligt.

Für das Studienzentrum Jena wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena ebenfalls ein positives Votum erteilt und darüber hinaus beschlossen, dass aufgrund des geringen Risikos keine konkrete Einverständniserklärung der Patienten notwendig ist.

4.4 Statistische Verfahren

Aufgabe war es, sowohl Sensitivität und Spezifität, als auch den negativ und positiv prädiktiven Wert zu bestimmen. Hierfür wurden die Ergebnisse wie in Tab. 6 dargestellt interpretiert.

Tab. 6: Interpretation der Ergebnisse: Standard gegen Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype

	Standard₁ (M)	Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype (C)
richtig positiv (RP)	positiv	positiv
richtig negativ (RN)	negativ	negativ
falsch positiv (FP)	negativ	positiv
falsch negativ (FN)	positiv	negativ
¹ Standard entspricht der kulturellen Anzucht nach entsprechender SOP des Institutes für Medizinische Mikrobiologie Jena		

Für die Auswertung der Ergebnisse im Sinne einer Vierfeldertafel wurden die Formeln aus Tab. 7 verwendet.

Tab. 7: Formel zur Berechnung der Vierfeldertafel

Sensitivität	$\frac{RP}{RP + FN}$
Spezifität	$\frac{RN}{RN + FP}$
positiv prädiktiver Wert	$\frac{RP}{RP + FP}$
negativ prädiktiver Wert	$\frac{RN}{RN + FN}$

4.5 Laborverfahren

Als Vergleichsstandard wurden konventionelle mikrobiologische Methoden zur Bakterienanzucht und Antibiotika-Resistenzbestimmung gewählt, die nach entsprechender SOP vom Personal des Institutes für Medizinische Mikrobiologie Jena durchgeführt wurden. Das Probenmaterial wurde auf nicht-selektiven Nährmedien, wie Blutagar und Kochblutagar, sowie auf selektiven Nährmedien, wie Winkleagar und Schaedlerplatte kultiviert. Mittels biochemischen Analysen wurden die Erreger dann identifiziert. Für Nachuntersuchungen wurden alle gefundenen Bakterienkulturen bei -80°C eingefroren und an die Firma Curetis verschickt. Die gewonnen Ergebnisse und Daten wurden mittels electronic case report form (eCRF) übermittelt. Die Rohdaten des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen wurden automatisch an die CRO geleitet.

4.5.1 Prototyp der Unyvero[®] Pneumonia Application

Beim Unyvero[®] Pneumonia Application Test handelt es sich um ein Gerät für eine automatisierte Multiplex-PCR bei der 14 typische Pneumonieerreger (s. Tab. 8) und drei atypische Erreger (s. Tab. 9) nachgewiesen werden können. Unter den atypischen Pathogenen befindet sich ein Pilz (*Pneumocystis jirovecii*). Die restlichen 16 Erreger sind Bakterien. Die Multiplex-PCR schließt auch 22 Resistenzgene verschiedener Bakterien ein (s. Tab. 10).

In Tab. 11 ist aufgeführt in welchen Pathogenen die getesteten Resistenzgene vorkommen. Dies ist Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse der Resistenzanalyse, da nur dann Resistenzen angegeben werden, wenn auch ein dazu passender Keim gefunden wurde.

Wenn beispielsweise ein *mecA* Gen identifiziert wurde, muss auch *Staphylococcus aureus* identifiziert werden, damit im Befund die Verknüpfung MRSA angezeigt wird. Fehlt der Nachweis von *Staphylococcus aureus*-spezifischer DNA, wird der positive Befund von *mecA* nicht angezeigt. In diesem speziellen Fall muss der Befund noch einmal gesondert bestätigt werden, da es eine hohe Rate an *mecA*-positiven koagulasenegativen Staphylokokken gibt, welche zur Normalflora der oberen Atemwege gehören und die Probe kontaminieren können.

Tab. 8: typische Pneumonieerreger im Probensetting

Pathogen	Target
<i>Acinetobacter baumannii</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Enterobacter spp.</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Escherichia coli</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Haemophilus influenzae</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Klebsiella oxytoca</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Moraxella catarrhalis</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Morganella morganii</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Proteus spp.</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Serratia marcescens</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Staphylococcus aureus</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	23 S rRNA - Gen
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	23 S rRNA - Gen

Tab. 9: atypische Pneumonieerreger im Probensetting

Pathogen	Target
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Unbekannt, proprietäres Protokoll der Firma
<i>Legionella pneumophila</i>	unbekannt
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	26 S rRNA

Tab. 10: Resistenzgene und ihre Erklärung (Thews 2012)

Resistenzgen	Genprodukt / Wirkungsort	Resistenz
<i>ctx-M</i> ¹	β-Laktamase, Cefotaximase	Penicillin, 3.Generation. Cephalosporine
<i>dha</i> ²	Cephalosporinasen (<i>ampC</i>)	3.Generation Cephalosporine
<i>ebc</i> ²	Cephalosporinasen (<i>ampC</i>)	3.Generation Cephalosporine
<i>ermA</i> ⁶	Methylase	Makrolide / Lincosamide
<i>ermB</i> ⁶	Methylase	Makrolide / Lincosamide
<i>ermC</i> ⁶	Methylase	Makrolide / Lincosamide
<i>gyrA83_2_Pseu</i> ¹²	Gyrase A	Fluorchinolone
<i>gyrA83_3_Pseu</i> ¹²	Gyrase A	Fluorchinolone
<i>gyrA83_Ecoli</i> ¹²	Gyrase A	Fluorchinolone
<i>gyrA87_2_Pseu</i> ¹²	Gyrase A	Fluorchinolone
<i>gyrA87_3_Pseu</i> ¹²	Gyrase A	Fluorchinolone
<i>gyrA87_Ecoli</i> ¹²	Gyrase A	Fluorchinolone
<i>int1</i> ⁹	Integrase, MDR Marker	Multidrug Resistance
<i>kpc</i> ³	Carbapenemase	Carbapenem
<i>mecA</i> ⁴	PBP 2A	Oxacillin, Penicillin, Methicillin
<i>mefA</i> ^{7,8}	Antiporter	Makrolide
<i>msrA</i> ^{6,8}	Antiporter	Makrolide
<i>oxa51</i> ^{1,5}	Carbapenemase	Carbapenem
<i>parC_Pseu</i> ¹²	Topoisomerase	Fluorchinolone
<i>shv</i> ¹	β-Laktamase	Penicillin, 3.Generation Cephalosporine
<i>sul1</i> ^{10,11}	DHPS	Sulfonamide
<i>tem</i> ¹	β-Laktamase	Penicillin, 3.Generation Cephalosporine
¹ (Bush und Jacoby 2010), ² (Perez-Perez und Hanson 2002), ³ (Queenan und Bush 2007), ⁴ (Ubukata et al. 1989), ⁵ (Bertini et al. 2006), ⁶ (Leclercq und Courvalin 1991), ⁷ (Clancy et al. 1996), ⁸ (Chouchani et al. 2012), ⁹ (Fluit und Schmitz 2004), ¹⁰ (Antunes et al. 2005), ¹¹ (Bennett 2008), ¹² (Han et al. 2012)		

Tab. 11: Vorkommen der Resistenzgene (Thews 2012)

	<i>tem</i>	<i>shv</i>	<i>ctx-M</i>	<i>dha</i>	<i>ebc</i>	<i>kpc</i>	<i>oxa51</i>	<i>mecA</i>	<i>msrA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>mefA</i>	<i>int1</i>	<i>sul1</i>	<i>gyrA83</i>	<i>gyrA87</i>	<i>parC</i>
<i>A. baumannii</i>																		
<i>C. pneumoniae</i>																		
<i>E. coli</i>																		
<i>Enterobacter sp.</i>																		
<i>H. influenzae</i>																		
<i>K. oxytoca</i>																		
<i>K. pneumoniae</i>																		
<i>L. pneumoniae</i>																		
<i>M. catarrhalis</i>																		
<i>M. morganii</i>																		
<i>P. aeruginosa</i>																		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>																		
<i>Proteus sp.</i>																		
<i>S. aureus</i>																		
<i>S. maltophilia</i>																		
<i>S. marcescens</i>																		
<i>S. pneumoniae</i>																		

Der Prototype der Unyvero[®] Pneumonia Application ist ein Vollautomat, der nachdem die Probenlyse separat durchgeführt wurde, die DNA-Aufreinigung, die Amplifikation der Zielsequenzen und die spezifische Detektion in sich vereint. Zur Analyse wurden 180 µl der Probe in das Unyvero[®] Pneumonia Application Probengefäß überführt und mittels mechanischer, thermischer, chemischer und enzymatischer Methoden in ca. 30 Minuten lysiert. Danach wurden die Proben in die Probenkassette überführt. Die Probenkassette ist mit den nötigen Reagenzien zur DNA-Aufreinigung, den PCR-Primern und den Hybridisierungs sonden bestückt. In acht Einzelkammern war durch End-Punkt-PCR eine qualitative Auswertung der Probe möglich. Anhand von Fluoreszenz-markierten PCR-Sonden (Sequenzen nicht veröffentlicht, Firmengeheimnis) wurden die jeweiligen Pathogene durch Hybridisierung an den PCR-Produkten detektiert und anschließend identifiziert. Die entstandenen Fragmente wurden über eine Porenmembran getrennt. Bei einer spezifischen Temperatur wurde der Photoeffekt ausgenutzt und ein Bild durch eine Charge-Coupled-Device (CCD) Kamera erstellt, welches mit dem Vergleichsbild der integrierten Software abgeglichen wurde. Als Kontrolle wurde eine Probe mit einem synthetisches Gen parallel bearbeitet. Der gesamte Prozess erfolgte vollautomatisiert an zwei Geräten, die Lyse der Proben an einem separaten Gerät.

4.5.2 Das konventionelle Verfahren in der Mikrobiologie des UKJ

Aktuell wird im klinischen Alltag beim Verdacht auf einen Atemwegsinfekt eine mikrobiologische Untersuchung in Form der kultureller Anzucht durchgeführt. Besonders gut geeignetes Material wird bei der bronchioalveolären Lavage (BAL) gewonnen, da sie bei richtiger Durchführung Material aus der unmittelbaren Umgebung des entzündeten Lungenareals liefern kann und zudem eine Kontamination durch Kolonisationskeime geringer ausfällt als beim Sputum. Allerdings wurden auch Trachealsekret und Sputum verwendet. Die Gewinnung der BAL-Probe der Jenenser Patienten erfolgte durch das Personal der Klinik für Innere Medizin I. Dem Patient wurde mittels Bronchoskop bis zu 160 ml isotonische Kochsalzlösung in dem Bronchialbaum appliziert. Anschließend wurde so viel wie möglich, mindestens aber 50 ml dieser Flüssigkeit zurückgewonnen. In der aspirierten Flüssigkeit findet man neben Alveolarepithelien auch Granulozyten, Leukozyten und mögliche Krankheitserreger, die in der Kultur oder mit der PCR identifiziert werden können. Für optimale Bearbeitungsergebnisse sollte die Probe staubfrei und steril sein. Die Transportzeit sollte unter vier Stunden liegen und die Probe dabei bei 4-6°C gelagert sein um die Stabilität

der Probe und die Konstanz der Keimzahl zu sichern. Anhand der Menge an instillierter Flüssigkeit und wie viel davon wieder aspiriert wurde, konnte das mögliche Keimwachstum eingeschätzt werden. Die mikrobiologische Diagnostik erfordert ein Probenvolumen von mehr als 5ml für ein korrektes Ergebnis.

Falls aufgrund besonderer Fragestellungen nötig, wurde die Probe geteilt und gegebenenfalls auf besondere Erreger wie z.B. *Pneumocystis jiroveci* oder *Mycobacterium tuberculosis* getestet.

Im Labor wurden die Proben durch die medizinisch technischen Laborassistenten/-innen (MTLA) gemäß entsprechender SOPs bearbeitet. Mittels Vortexer wurde die Probe gemischt und nach Bedarf mit 1% N-Acetyl-L-Cystein-Lösung verflüssigt (Saupe 2011c).

Die BAL-Proben wurden mikroskopiert um schnell eine erste Information zum Mikroorganismus (grampositiv, gramnegativ) zu bekommen und die Qualität der Probe abzuschätzen. Befinden sich mehr Plattenepithelien (PE) als Flimmerepithelien in der Probe ist dies ein Hinweis auf eine schlechte Qualität der Probe. Sie ist mit Speichel kontaminiert, wenn mehr als 1% aller Zellen im mikroskopischen Präparat Plattenepithelien sind (DIN 2012). Während andererseits mehr als 20% Granulozyten typisch für eine Entzündung oder eine Infektion sind.

Als Färbung wurde die Gram-Färbung verwendet. Die Gramfärbung dient der Keimanalyse und Beurteilung der Zellzahl und ihrer Morphologie. Die Beurteilung erfolgte vorrangig durch einen Akademiker und wurde dem behandelnden Kliniker zeitnah mitgeteilt.

Für die Anzucht von Bakterien wurden routinemäßig Blutagar, Kochblutagar und Winkleagar genutzt. Der Winkleagar ist mit Indikatoren wie z.B. Bromthymolblau versetzt (v.Wulffen 2004) und stellt einen selektiven Agar für gramnegative Bakterien dar. Dagegen benötigt *Haemophilus influenzae* den Kochblutagar zum Wachstum, da er nur hier an Hämin und NAD kommt, welche er selbst nicht aus dem Blut hämolysieren kann. Bei Verdacht auf Anaerobier wurde zusätzlich eine Schaedlerplatte mit Vancomycin- oder Kanamycinzusatz beimpft (Saupe 2011c).

Die Kochblutplatte wurde mittels steriler Pipette mit 100 µl der Probe beimpft und gleichmäßig ausgespatelt. Die anderen Nährmedien wurden einfach mit der Öse beimpft.

Erweiternd konnten Spezialnährmedien für MRSA und Pilze verwendet werden.

Nach Anlage der Platten wurden sie für etwa 48 Stunden bei 36 (± 2 °C) bebrütet und nach etwa einem Tag zwischenbefundet. Die Blut- und Kochblutagar wurden in einer 5% CO₂-

Atmosphäre bebrütet. Bei Keimwachstum wurde eine Identifikations- und Resistenzbestimmung durchgeführt (Saupe 2011c).

Für eine Pneumonie ist die Keimlast $\geq 10^4$ KBE/ml in der BAL (Podbielski 2010) diagnostisch aussagekräftig. Dabei sollten die vermutlich verursachenden Mikroorganismen in höherer Konzentration vorliegen als Kolonisationskeime der Normalflora.

Anders als bei der BAL wird bei der Gewinnung von Trachealsekret oder Sputum keine zusätzliche Flüssigkeit instilliert, sondern das vorhandene Sekret abgesaugt bzw. durch den Patienten abgehustet.

Als Trachealsekret bezeichnet man Sekret, was aus der Trachea über einen Katheter gewonnen wird und ist daher nur bei intubierten Patienten indiziert (Saupe 2011a).

Sputum dagegen wird aktiv vom Patienten abgegeben. Dabei ist zu beachten, dass Speichel nicht als Untersuchungsmaterial geeignet ist. Außerdem muss Sputum innerhalb von zwei Stunden bearbeitet werden (Saupe 2011b). Von beiden Materialien wurden 0,5-1 ml für die konventionelle mikrobiologische Diagnostik benötigt. Ebenso wie bei der BAL wurden von Trachealsekreten und Sputen Grampräparate hergestellt und beurteilt.

Entscheidend ist, dass nur Material mit weniger als 25 PE und erkennbaren Granulozyten weiterbearbeitet wurde. Besonders hochwertig sind Materialien mit weniger als 10 PE und mehr als 25 Granulozyten einzustufen, da eine Kontamination mit Speichel hier gering ist (Geckler et al. 1985).

Der kulturelle Ansatz war der Gleiche, wie bei der BAL (Saupe 2011b, Saupe 2011a). Im Falle einer Pilzkultur wurde sieben Tage bebrütet. Für die Einschätzung der Keimlast wurde der 3-Ösen-Ausstrich semiquantitativ nach dem in Tab. 12 erläuterten Schema bewertet.

Tab. 12: Semiquantitative Bewertung des 3-Ösenausstrichs

Wachstum	Vorkommen	Bewertung
nur im 1. Impfstich	Wenig	+
auch im 2. Impfstich	Viel	++
auch im 3. Impfstich	massenhaft	+++

5 Ergebnisse

5.1 Auswertung der Performanz des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen

5.1.1 Patienten und Proben

In der Zeit von März 2012 bis September 2012 wurden 302 Patienten in Jena in die Curetis Studie "Detection of Pneumonia associated Pathogens and Antibiotic Resistance Genes using the Curetis Unyvero® Pneumonia Application Prototype" aufgenommen.

Aufgrund von System- und Hardwarefehlern konnten 24 Proben nicht zur Analyse genutzt werden. Weitere 31 Proben konnten nicht analysiert werden, weil es zu Ausfällen in den Probenkassetten kam.

Entsprechend der Ausschlusskriterien wurden wie folgt weitere 40 Proben ausgeschlossen. 28 Proben, weil sie länger als 18 Stunden gelagert wurden, bevor sie zur Untersuchung kamen. Zwei Proben wurden ausgeschlossen, weil die Patienten unter 18 Jahre alt waren. Sieben Proben wurden ausgeschlossen, da sie erneut innerhalb von fünf Tagen untersucht wurden. Zwei Proben wurden wegen in Frage stehender Tuberkulose ausgeschlossen. Eine Probe wurde ausgeschlossen, weil sie aus einer Transplantationsspenderlunge gewonnen wurde und somit keine Aussage zur Herkunft möglich war.

Insgesamt wurde somit 207/302 Proben ausgewertet. Sie wurden für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität, so wie positiv prädiktiven Wert (PPW) und den negativ prädiktiven Wert (NPW) als Gesamtpopulation (n) zusammengefasst.

Die schematische Übersicht zum Ein- und Ausschlussverfahren befindet sich in Abb. 1.

Die zu den Proben gehörenden Patienten waren zwischen 18 und 94 Jahre alt, bei einem Durchschnittsalter von 61 Jahren. Die Population setzte sich aus 154 Männern und 53 Frauen zusammen. Etwa 80% der Proben (163/207) wurden von Patienten der Intensivstation gewonnen. Die restlichen Proben (44/207) stammen von Patienten aus dem peripher stationären Bereich.

Aus den 207 Patientenproben konnten 75 Pathogene in 63 verschiedenen Proben konventionell angezüchtet werden. Aufgrund von technischen Störungen war es nur bei 52 dieser Pathogene möglich die Analyse mit dem Unyvero® Pneumonia Application Prototypen

durchzuführen. Dabei wurden 77% der Pathogene entdeckt (40/52), 23% (12/52) wurden nicht korrekt vom Unyvero® Pneumonia Application Prototypen identifiziert.

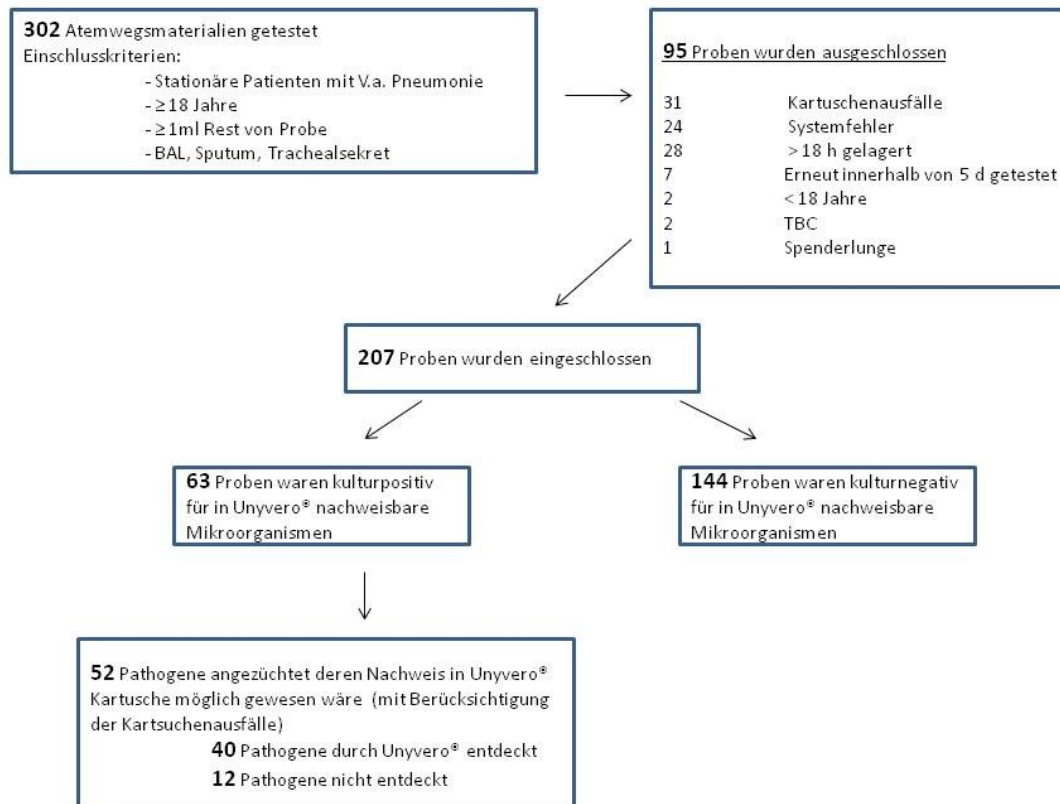


Abb. 1: Schema zum Ein- und Ausschlussverfahren

5.1.2 Praxistauglichkeit des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen

Die beschriebene Multiplex-PCR war ein Prototyp, der getestet wurde um ihn zu verbessern und mögliche Fehlfunktionen zu erkennen und auszubessern. Der Automat aus Jena wurde während der Testphase dreimal gewechselt und zweimal repariert.

Im Ergebnisprotokoll wurden die Befunde wie in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: Bewertung des PCR Ergebnisses

x	nicht analysiert
-	negativ, kein Erregernachweis
+	positiv, Erreger identifiziert

Während der Testung kam es zu Fehlern und Abbrüchen, die dazu führten, dass Analysen einzelner Pathogene nicht durchgeführt werden konnten. Aufgrund des Aufbaus der Probenkartusche in acht Einzelkammern gibt es eine räumliche Trennung zwischen Gruppen von Pathogenen, die es möglich macht, dass die nicht gestörten Kammerteile funktionieren und ausgewertet werden konnten.

Je nach auftretendem Fehler kam es entweder zum kompletten Ausfall der Kartusche, was zu einem Ausschluss aus der Studie führte oder nur zu Teilausfällen.

Teilausfall bedeutet, dass nur einzelne Pathogene nicht bearbeitet werden konnten und im Protokoll mit "x" verzeichnet wurden. Die Teilausfälle wurden für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität herausgefiltert. Durchgeführte Analysen (-, +) konnten dagegen mit in die Berechnung einfließen.

Unter den eingeschlossenen Proben waren 3519 Nachweisreaktionen möglich. Jedoch gab es knapp 35% Teilausfälle (1225/3519).

Die Berechnung der Vierfeldertafel wurde also an einer Probenmenge von etwa 65% (2294/3519) der eingeschlossenen Proben durchgeführt.

5.1.2.1 Technische Fehler des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen

Im Verlauf der Studie konnten durch die Firma Curetis folgende Fehler eruiert werden.

Im gesamten Studienfeld waren in 23,8% die Kontrollgene der Reaktion nicht intakt. Des Weiteren kam es zu Pumpen- (5,6%) und Rasterfehlern (4,9%).

Ein Versagen des Kontrollgens kann viele Ursachen gehabt haben. In Frage kommen Pipettierfehler, so dass kein Kontrollgen in der Probenkartuschen war oder dass die PCR nicht funktionierte. Das Kontrollgen ist die sogenannte Inhibitionskontrolle und wird in jeder der acht Einzelkammern nachgewiesen, wird diese Kontrollstufe nicht bestanden, können die nachfolgenden Analysen der Patientenprobe für diese Einzelkammer nicht ausgewertet

werden, es entsteht ein Teilausfall Die restlichen sieben Einzelkammern sind davon unabhängig.

Pumpenfehler führten zu insuffizientem Waschen während der Hybridisierung oder zu fehlerhafter Pufferung in den einzelnen PCR-Reaktionskammern.

Rasterfehler waren primär Softwarefehler. Die hybridisierten DNA-Fragmente konnten nicht richtig identifiziert werden und wurden somit nicht von der Software erkannt.

5.1.2.2 Time to Result

Bei den eingeschlossenen Untersuchungsproben dauerte eine Analyse mit dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen im Schnitt etwa 5,25 Stunden bis zur Ausgabe des Befundes am Gerät.

Die konventionelle Mikrobiologie dauerte dagegen durchschnittlich drei Tage und acht Stunden. Diese Dauer wurde für alle Proben gleich bestimmt. Es ist die Zeit zwischen kulturellen Ansatz und Erstellung des Endbefunds.

5.1.3 Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW

5.1.3.1 Bewertung der Sensitivität und Spezifität ohne Beachtung der laufenden Antibiose

Im Rahmen der Studie konnte für den Standort Jena eine Gesamtsensitivität der Multiplex-PCR mit Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype von 63% erreicht werden. Dabei ist die Spanne ziemlich weit und stark abhängig vom Pathogen.

Die Spezifität des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen liegt bei 96,5%.

Die speziesbezogenen Sensitivitäten und Spezifitäten sind in Tab. 6 zu sehen.

Besonders auffällig waren die PPW für *Streptococcus pneumoniae* (3%) und *Klebsiella pneumoniae*, so wie *Serratia marcescens*. Die beiden letzten konnten zu 100% richtig erkannt werden.

Allerdings wertete der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype bei *Klebsiella pneumoniae* einige Funde mit geringen Pathogenkonzentrationen als negativ, obwohl die konventionelle Mikrobiologie sie eindeutig nachweisen konnte. Dies kam zustande durch die

voreingestellten Konzentrationsschwellen im Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen. Bei den zehn angezüchteten *Klebsiella pneumoniae* kam dies fünfmal vor.

Ähnliche Fälle gab es auch viermal bei *Staphylococcus aureus* (4/16). Dies sollte bei der Bewertung der Sensitivität beachtet werden, da diese Fälle als falsch negativ (FN) gewertet wurden.

Aufgrund fehlender Befunde konnte für viele Pathogene die Sensitivität und der PPW nicht bestimmt werden. In der Tab. 14 sind diese mit "n.a." gekennzeichnet.

Tab. 14: Auswertung der Vierfeldertafel der Ergebnisse des Unyvero® Prototypen

Pathogen	gesamt	n	x	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
<i>S. pneumoniae</i>	207	140	67	1,00	0,78	0,03	1,00
<i>S. aureus</i>	207	136	71	0,61	0,99	0,92	0,94
<i>P. aeruginosa</i>	207	130	77	0,50	0,98	0,60	0,98
<i>A. baumannii</i>	207	162	45	n.a.	1,00	n.a.	1,00
<i>L. pneumophila</i>	207	162	45	n.a.	1,00	n.a.	1,00
<i>M. catarrhalis</i>	207	140	67	n.a.	0,96	n.a.	1,00
<i>S. maltophilia</i>	207	162	45	0,83	0,92	0,28	0,99
<i>Enterobacter sp.</i>	207	123	84	n.a.	0,94	n.a.	1,00
<i>E. coli</i>	207	155	52	0,43	0,99	0,75	0,97
<i>K. pneumoniae</i>	207	104	103	0,50	1,00	1,00	0,95
<i>K. oxytoca</i>	207	76	131	n.a.	0,99	n.a.	1,00
<i>M. morganii</i>	207	138	69	n.a.	0,99	n.a.	1,00
<i>Proteus sp.</i>	207	136	71	0,40	0,99	0,67	0,98
<i>S. marcescens</i>	207	164	43	0,75	1,00	1,00	0,99
<i>H. influenzae</i>	207	138	69	n.a.	0,88	n.a.	1,00
<i>C. pneumoniae</i>	207	136	71	n.a.	1,00	n.a.	1,00
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	207	155	52	n.a.	1,00	n.a.	1,00
	Durchschnitt			62,79%	96,54%	52,42%	98,91%
n:	auswertbare Proben						
x:	nicht auswertbare Proben, Reaktionsausfälle						
PPW:	positiv prädiktiver Wert						
NPW:	negativ prädiktiver Wert						

Die genaue Auswertung der Testergebnisse der 17 Pathogene im Bezug zur konventionellen Mikrobiologie sind in Tab. 15 zu sehen.

Tab. 15: Vierfeldertafel der Ergebnisse des Unyvero® Prototypen

Pathogen	gesamt	n	x	C+/M+	C+/M-	C-/M-	C-/M+
<i>S. pneumoniae</i>	207	140	67	1	31	108	0
<i>S. aureus</i>	207	136	71	11	1	117	7
<i>P. aeruginosa</i>	207	130	77	3	2	122	3
<i>A. baumannii</i>	207	162	45	0	0	162	0
<i>L. pneumophila</i>	207	162	45	0	0	162	0
<i>M. catarrhalis</i>	207	140	67	0	5	135	0
<i>S. maltophilia</i>	207	162	45	5	13	143	1
<i>Enterobacter sp.</i>	207	123	84	0	7	116	0
<i>E. coli</i>	207	155	52	3	1	147	4
<i>K. pneumoniae</i>	207	104	103	5	0	94	5
<i>K. oxytoca</i>	207	76	131	0	1	75	0
<i>M. morganii</i>	207	138	69	0	2	136	0
<i>Proteus sp.</i>	207	136	71	2	1	130	3
<i>S. marcescens</i>	207	164	43	3	0	160	1
<i>H. influenzae</i>	207	138	69	0	17	121	0
<i>C. pneumoniae</i>	207	136	71	0	0	136	0
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	207	155	52	0	0	182	0
n: auswertbare Proben x: nicht auswertbare Proben, Reaktionsausfälle C: Unyvero Testergebnis M: kulturelles Ergebnis der Mikrobiologie Jena +: Pathogen nachgewiesen -: Pathogen nicht nachgewiesen							

Die Differenzen der Befunde für *Streptococcus pneumoniae* wurden aus den Rückstellproben nachgetestet. Hierbei wurden zusätzliche Pneumokokken spezifische Markergene verwendet, dazu zählen: *cpsA*, *lytA*, *plyA*, *rpoB*.

Es konnten von den 69 fraglichen Befunden der gesamten europäischen Studie lediglich fünf nachträglich als *Streptococcus pneumoniae* gesichert werden. Bei den verbliebenen 64 konnte keine eindeutige Spezies zugeordnet werden. Es war aber möglich sie als *Streptococcus spp.* zu deklarieren.

5.1.3.2 Bewertung der Sensitivität und Spezifität unter Beachtung der bestehende Antibiotikabehandlung

Unter der eingeschlossenen Studienpopulation (n=207) allein wurden 84 Pathogene durch den Unyvero® Pneumonia Application Prototypen nachgewiesen, die kulturell nicht nachgewiesen werden konnten. 63 dieser Pathogene wurden aus Patienten isoliert, die zum Testtag bereits antibiotisch behandelt waren.

Aufgrund dessen wurden nachfolgend die Sensitivität und die Spezifität neu bewertet, wobei die antibiotische Therapie mit berücksichtigt wurde. Die vom Unyvero® Pneumonia Application Prototypen detektierten Erreger wurden dafür als vollsensibel angesehen, außer wenn sie natürliche Resistenzen gegen das gegebene Antibiotikum haben. Die Grundlage der Überlegung ist, dass das Vorhandensein eines Antibiotikums das kulturelle Anwachsen behindert und somit einige Ergebnisse als falsch positive Befunde deklariert wurden. In Tab. 16 sind die Neubewerteten Ergebnisse des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen dargestellt. Es ist sichtbar, dass vor allem die oben beschriebenen Makel des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen durch die Beachtung der Antibiotika verbessert werden konnten. Bei *Streptococcus pneumoniae* verändert sich der PPW von 3% auf 68%, auch im Falle von gab es viele Patienten die bereits ein wirksames Antibiotika erhielten und somit anstatt 17 falsch positiven Befunden nur noch acht als falsch positiv gewertet wurden.

All diese Ergebnisse führten dazu, dass es eine allgemeine Verbesserung der Sensitivität (von 62,8% auf 76,4%) und Spezifität (von 96,5% auf 98,3%) gibt, wenn man die Antibiotikagabe berücksichtigt.

Die Tab. 17 zeigt die veränderten Ergebnisse für Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW unter Beachtung der zum Testtag laufenden Antibiose.

Tab. 16: Vierfeldertafel der Ergebnisse des Unyvero® Prototypen unter Beachtung der antibiotischen Vorbehandlung

Pathogen	gesamt	n	x	C+/M+	C+/M-	C-/M-	C-/M+
<i>S. pneumoniae</i>	207	140	67	21	10	108	0
<i>S. aureus</i>	207	136	71	12	0	117	7
<i>P. aeruginosa</i>	207	130	77	5	0	122	3
<i>A. baumannii</i>	207	162	45	0	0	162	0
<i>L. pneumophila</i>	207	162	45	0	0	162	0
<i>M. catarrhalis</i>	207	140	67	2	3	135	0
<i>S. maltophilia</i>	207	162	45	9	9	143	1
<i>Enterobacter sp</i>	207	123	84	2	5	116	0
<i>E. coli</i>	207	155	52	4	0	147	4
<i>K. pneumoniae</i>	207	104	103	5	0	94	5
<i>K. oxytoca</i>	207	76	131	0	1	75	0
<i>M. morgani</i>	207	138	69	0	2	136	0
<i>Proteus sp</i>	207	136	71	3	0	130	3
<i>S. marcescens</i>	207	164	43	3	0	160	1
<i>H. influenzae</i>	207	138	69	9	8	121	0
<i>C. pneumoniae</i>	207	136	71	0	0	136	0
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	207	155	52	0	0	182	0
n: auswertbare Proben x: nicht auswertbare Proben, Reaktionsausfälle C: Unyvero Testergebnis M: kulturelles Ergebnis der Mikrobiologie Jena +: Pathogen nachgewiesen -: Pathogen nicht nachgewiesen							

Tab. 17: Auswertung der Vierfeldertafel der Ergebnisse des Unyvero® Prototypen unter Beachtung der antibiotischen Vorbehandlung

Pathogen	gesamt	n	x	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
<i>S. pneumoniae</i>	207	140	67	1,00	0,92	0,68	1,00
<i>S. aureus</i>	207	136	71	0,63	1,00	1,00	0,94
<i>P. aeruginosa</i>	207	130	77	0,63	1,00	1,00	0,98
<i>A. baumannii</i>	207	162	45	n.a.	1,00	n.a.	1,00
<i>L. pneumophila</i>	207	162	45	n.a.	1,00	n.a.	1,00
<i>M. catarrhalis</i>	207	140	67	1,00	0,98	0,40	1,00
<i>S. maltophilia</i>	207	162	45	0,90	0,94	0,50	0,99
<i>Enterobacter sp</i>	207	123	84	1,00	0,96	0,29	1,00
<i>E. coli</i>	207	155	52	0,50	1,00	1,00	0,97
<i>K. pneumoniae</i>	207	104	103	0,50	1,00	1,00	0,95
<i>K. oxytoca</i>	207	76	131	n.a.	0,99	0,00	1,00
<i>M. morganii</i>	207	138	69	n.a.	0,99	0,00	1,00
<i>Proteus sp</i>	207	136	71	0,50	1,00	1,00	0,98
<i>S. marcescens</i>	207	164	43	0,75	1,00	1,00	0,99
<i>H. influenzae</i>	207	138	69	1,00	0,94	0,53	1,00
<i>C. pneumoniae</i>	207	136	71	n.a.	1,00	n.a.	1,00
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	207	155	52	n.a.	1,00	n.a.	1,00
	Durchschnitt			76,42%	98,25%	64,56%	98,86%
n:	auswertbare Proben						
x:	nicht auswertbare Proben, Reaktionsausfälle						
PPW:	positiv prädiktiver Wert						
NPW:	negativ prädiktiver Wert						

5.1.3.3 Auswertung der Resistenzgenanalysen

In Tab. 18 werden die Ergebnisse des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen für die Resistenzanalysen dargestellt. Aufgrund der hohen Ausfallrate, fehlender Keimfunde im Standard oder fehlendem Pathogen in der Analyse des Unyvero® Pneumonia Application Prototypen konnten keine Werte für Sensitivität, Spezifität, PPW oder NPW bestimmt werden.

Tab. 18: Ergebnisse der Resistenzanalysen des Unyvero[®] Prototypen

Resistenzgen	gesamt	x	n	-	+
<i>tem</i>	207	131	76	71	5
<i>shv</i>	207	69	138	131	7
<i>ctx-M</i>	207	43	164	157	7
<i>dha</i>	207	53	154	152	2
<i>ebc</i>	207	103	104	102	2
<i>kpc</i>	207	43	164	164	0
<i>oxa51</i>	207	69	138	134	4
<i>mecA</i>	207	103	104	101	3
<i>msrA</i>	207	131	76	71	5
<i>ermA</i>	207	131	76	75	1
<i>ermC</i>	207	52	155	117	38
<i>mefA</i>	207	103	104	71	33
<i>ermB</i>	207	45	162	84	78
<i>int1</i>	207	71	136	131	5
<i>sul1</i>	207	67	140	104	36
<i>gyrA83_Ecoli</i>	207	70	137	137	0
<i>gyrA87_Ecoli</i>	207	60	147	147	0
<i>gyrA83_2_Pseu</i>	207	144	63	63	0
<i>gyrA83_3_Pseu</i>	207	148	59	59	0
<i>gyrA87_2_Pseu</i>	207	139	68	68	0
<i>gyrA87_3_Pseu</i>	207	137	70	70	0
<i>parC_Pseu</i>	207	145	62	62	0
x : nicht auswertbare Proben n : auswertbare Proben + : positiv Befund - : negativ Befund					

5.2 Ergebnisse der klinische Auswertung

5.2.1 Patienten und Proben

In der weiterführenden Analyse wurden Proben von Patienten der Intensivstation ausgewertet, die konventionell und mittels Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype getestet wurden und keine Mukoviszidose hatten.

In 78 Proben konnte der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype ein oder mehrere Pathogene detektieren, wobei einige konventionell nicht nachgewiesen wurden. Ebenso gab es darunter Fälle bei denen der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype das Pathogen nicht nachwies, dagegen aber die konventionelle Mikrobiologie.

Diese 78 Proben wurden von 73 verschiedenen Patienten gewonnen und ermöglichten so in einzelnen Fällen eine Entwicklung sichtbar zu machen.

Zum Beispiel konnte bei einer Patientin mit Zustand nach Lebertransplantation vor zwei Monaten eine Pneumonie eindeutig röntgenologisch nachgewiesen werden und auch das Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* durch die konventionellen Mikrobiologie und den Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen identifiziert werden. Dabei zeigte sich die Entwicklung sehr genau in den PCR-Werten des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen. Der Anfangswert am 14.04.12 wurde vom Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen noch als negativ ermittelt, da die Konzentration zu gering war (Ergebniswert: 107). Der Keim war konventionell ebenfalls anzüchtbar und wurde bereits durch die Kliniker mit Ceftazidim korrekt behandelt. Allerdings zeigte sich keine Verbesserung der Entzündungsparameter.

In den beiden darauf folgenden Analysen (27.04.12., 02.05.12) konnte erst eine deutliche Steigerung auf 511 und dann ein Abfall auf 257 für den PCR-Wert des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen gemessen werden. Der Anstieg könnte bedingt dadurch gewesen sein, dass der Erreger seine Resistenzlage verändert hatte und bei der zweiten Messung eine intermediäre Sensibilität für Ceftazidim hatte. Die Kliniker ergänzten darauf die Antibiose mit Colistin. Leider ist nicht klar, ob die Analyse durch den Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen die Situation der Patientin verbessert oder verschlechtert hätte, da sich die Patienten im Multiorganversagen befand. Die Patientin erlag ihrem Leiden kurze Zeit später.

Es war allerdings möglich einen Therapieeffekt im Sinne eines Abfalls der Keimlast von 511 auf 257 zu erkennen. Für die Veranschaulichung der Befundausgabe befindet sich ein Beispiel Befund im Anhang Abb. 3 und Abb. 4.

Die Studienpopulation war im Mittel 64 Jahre alt, der jüngste Patient war zum Testtag 33 Jahre alt, der älteste 90 Jahre. Es waren mehr Männer als Frauen eingeschlossen. Es gab 61 Proben von Männern und 17 Proben von Frauen.

42-mal konnte anhand des klinisch-radiologischen Bildes und der Laboranalyse die Diagnose Pneumonie gestellt werden. Diese Patienten werden nachfolgend als Pneumonieklienten bezeichnet.

Die restlichen 36 Proben waren von Klienten mit Entzündungszeichen, die nicht sicher auf eine Pneumonie zurückgeführt werden konnten und auch radiologisch nicht dem Bild einer Pneumonie entsprachen. 22 von diesen Fällen konnte ein Atemwegsinfekt zugeordnet werden. Bei den verbleibenden 14 Proben sind die Entzündungszeichen durch unbekannte Ursachen hervorgerufen. Diese beiden Klientengruppen werden nachfolgend als Nicht-Pneumonieklienten zusammengefasst. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 2 zu finden.

Ziel der Auswertung ist es zu zeigen, ob der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype einen Impact für den Klinikalltag haben würde oder ob die Klienten aufgrund der kalkulierten Therapie schon korrekt behandelt sind.

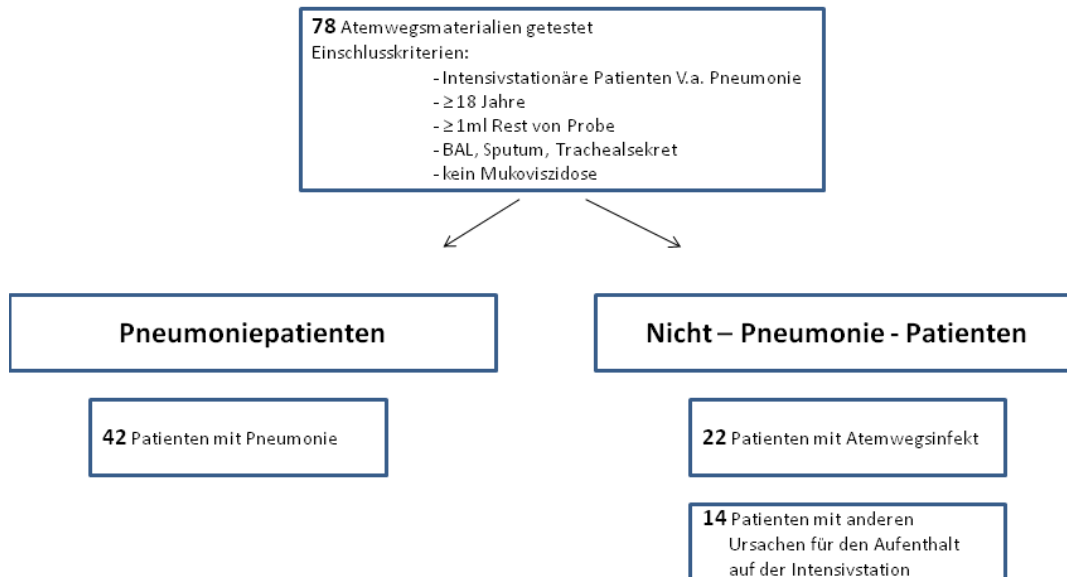


Abb. 2: Gruppenzuordnung der Patienten

5.2.2 Auswertung der Laborparameter

Im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten konnte gezeigt werden, dass bei Pneumoniepatienten lediglich die Leukozytenwerte signifikant höher sind. Im Durchschnitt hatten Pneumoniepatienten mit $\approx 14,9$ Gpt/l (1,8 - 34,0 Gpt/l) erhöhte Leukozytenwerte im Blut, während sie bei Nicht-Pneumonie-Patienten mit $\approx 11,7$ Gpt/l (5,5 - 20,2 Gpt/l) und $\approx 11,8$ Gpt/l (3,5 - 28,1 Gpt/l) nur knapp erhöht waren. Die statistische Signifikanz dieses Unterschiedes konnte mit $p=0,03$ gezeigt werden und ist in Tab. 19 ersichtlich. Es zeigt sich jedoch, dass die Wertespanssen sich stark überschneiden.

Die verwendeten statischen Tests wurde mit Fr. Dr.-Ing. Heike Hoyer, M.Sc. Epidemiology besprochen und mit SPSS[®] durchgeführt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, da die Werte nicht normalverteilt waren.

Tab. 19: Mann-Whitney-U-Test für Leukozytenwerte im Zusammenhang mit dem Pneumoniestatus
Ränge

	Pyn	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Leukozyten	Pneumonie	41	36,78	1508,00
	unbekannt	24	26,54	637,00
	Gesamt	65		
Pyn Gruppenvariable: Pneumoniestatus				

Statistik für Test^a

Leukozyten	
Mann-Whitney-U	337,000
Wilcoxon-W	637,000
Z	-2,107
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,035
a Gruppenvariable: Pneumonie ja / nein	

Weitere Laborparameter wie PCT und CRP waren zwar häufig erhöht, es konnte aber nicht gezeigt werden, dass sie sich von Nicht-Pneumonie-Patienten signifikant unterscheiden. Auffälligkeiten ließen sich wie in Tab. 20 aufgeführt in den Durchschnittswerten zeigen. Pneumoniepatienten hatten am Testtag durchschnittlich einen niedrigeren CRP-Wert von $\approx 117,8$ mg/l (6,6 - 283,7 mg/l) als die Nicht-Pneumonie-Patienten mit $\approx 144,1$ mg/l (<2,0 - 322,9 mg/l) und $\approx 147,9$ mg/l (10,7 - 429 mg/l). Dagegen stieg ihr CRP-Wert am vierten Tag nach der Analyse im Schnitt um 26%, während er bei den Atemwegsinfektionen konstant hoch blieb und bei den Patienten mit anderen Ursachen für den Aufenthalt auf der Intensivstation sogar um 35% abfiel.

Das Procalcitonin war bei Pneumoniepatienten am Testtag etwa 30% höher als bei Patienten mit Atemwegsinfekt und etwa 18% höher als bei denen mit anderen Ursachen für den Aufenthalt auf der Intensivstation.

Tab. 20: Laborwerte Durchschnitt

	Pneumonie	Keine Pneumonie	Atemwegsinfekt
Leukozyten (Gpt/L)	14,9	11,7	11,8
CRP Testtag (mg/l)	117,8	144,1	147,9
CRP 4 d post Test (mg/l)	148,5	93,6	150,2
PCT Testtag (ng/ml)	5,63	4,75	4,34
d post Test: Tage nach dem Test mit dem Unyvero [®] Pneumonia Application Prototypen			

6 Diskussion

Der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype ist ein schnelles, kulturunabhängiges Nachweisverfahren für Erreger von Atemwegsinfektionen, dass vor allem für Pneumonien vorgesehen ist, die stationär behandelt werden müssen. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Bearbeitungszeit von Untersuchungsmaterialien durch den Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen deutlich reduziert wird. Mit ca. sechs Stunden gehört der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype derzeit zu einer der schnellsten Nachweismöglichkeiten von Keimen in Atemwegsmaterialien. Im Krankenhaus würde diese Geschwindigkeit eindeutig zu einer Verbesserung der Therapie führen, da die Patienten schnell eine ausreichende Antibiose bekommen würden, welche sich speziell nach dem Erreger richtet und somit eine Breitspektrumtherapie vermieden werden kann. Es ist anzunehmen, dass die gezieltere Behandlung sich positiv auf die Resistenzentwicklung auswirken würde.

Aktuell ist der Erregernachweis in den Leitlinien für die Diagnostik und Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie nicht vorgesehen, obwohl ein Großteil der jährlich auftretenden Pneumonien ambulant behandelt wird. Dies könnte sich durch die schnelle Bearbeitung der Probe mit dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen ändern und somit eine gezieltere Behandlung ermöglichen und auch hier die Antibiotikaresistenzen verringern. Zu beachten ist allerdings, dass die Analyse mittels Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype für den ambulanten Sektor wahrscheinlich zu teuer ist.

Der Anschaffungspreis für das komplette System beläuft sich laut Angaben der Firma Curetis auf 56.700,00 € (Brockmann 2013) und übersteigt damit möglicherweise den finanziellen Rahmen einer Hausarztpraxis. Selbst wenn ein privates Labor den Automaten besitzt und die Analysen für den ambulanten Praktiker durchführt, kostet eine Kartusche inklusive Mastermix 192,00 € (Brockmann 2013). Das ist etwa das Sechsfache der Kosten einer konventionellen mikrobiologischen Diagnostik am UKJ inklusive Personalkosten (Taut 2012).

Dagegen könnten große Kliniken wie das Universitätsklinikum Jena von der neuen Technik auch finanziell profitieren. Aktuell belaufen sich die durchschnittlichen Tageskosten eines Patienten auf Intensivstation im Universitätsklinikum Jena auf 1220 €. Dagegen kostet ein Tag auf der peripheren Station für Pneumologie im Schnitt 200 € (Kräplin 2014). Die

Hoffnung besteht darin mit dieser schnellen Analysemöglichkeit von Curetis die Liegezeit deutlich zu verkürzen und somit Kosten einzusparen, da bekannt ist, dass die Liegezeit den Großteil der Krankenhauskosten erzeugt (Bauer et al. 2005).

In einer älteren Studie konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Behandlung des Patienten durch die Erweiterung der Diagnostik positiv beeinflusst wird (Oosterheert et al. 2005). Eine Wiederholung dieser Studie unter Einbeziehung neuer kulturunabhängiger, molekularbiologischer Diagnostik wäre sicher sinnvoll, da auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass vor allem Materialien von antibiotisch vorbehandelten Patienten ein Problem in der Diagnostik von Erregern machen. Sie machen einen großen Teil (81/207, ca. 40%) der analysierten Patientenpopulation aus.

In der vorliegenden Studie wurde der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype vorwiegend an Patienten der Intensivstation (n=163) getestet. Wie bereits beschrieben, ist das Erregerspektrum hier anders als bei einer ambulanten Pneumonie und die Patienten sind häufig schon antibiotisch vorbehandelt. Die Vorbehandlung stellt mit Sicherheit ein Problem für die Bewertung der Ergebnisse dar, insbesondere der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik (Nolte 2008). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass DNA von Erregern bis zu 60 Tage nach Antibiotikagabe noch im Blut aufzufinden sind (Rampini et al. 2011). Es ist anzunehmen, dass es zu ähnlichen Ergebnissen in Atemwegsmaterialien kommt und sich auch kulturell nicht bestätigte Erregernachweise aus dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen darauf beziehen. Daher sei zu bedenken, dass einige der falsch positiven Keimfunde in dem Sinne korrekt sind, dass die Keime vorhanden waren und zum Zeitpunkt der molekularbiologischen Untersuchung bereits inaktiviert waren oder durch das Antibiotikum am Wachsen gehindert wurden. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit positiven PCR Ergebnis und negativen Kulturbefund meist antibiotisch vorbehandelt waren (Morozumi et al. 2006). Dabei lässt sich häufig aber nicht mehr sagen, ob es sich um abgelaufene oder noch aktive Infektion handelt.

Die dazu durchgeführte Auswertung zu Sensitivität und Spezifität zeigt eine deutliche Verbesserung dieser, wenn man die Antibiose mit beachtet. So konnte die Gesamtsensitivität von 62,8% (ohne Beachtung der laufenden Antibiose) auf 76,4% (unter Beachtung der laufenden Antibiose) gesteigert werden. Um diese Steigerung zu belegen, sollte der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype nochmals mit einem weiteren kulturunabhängigen Verfahren verglichen werden. Hierfür würden sich die real-time-PCR oder die Singleplex-PCR eignen.

Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass stets das Befinden des Patienten mit bewertet werden muss, da eine PCR wie beschrieben auch inaktive Pathogen-DNA nachweisen kann. Ein Blick auf die aktuellen Infektionssymptome sind daher immer nötig. Zu dem lässt es sich beim Keimnachweis aus dem Respirationstrakt schwer erkennen, ob es nur eine Kolonisation oder eine Infektion ist, da die obere Atemwege nicht steril sind. Eine Bewertung der Testergebnisse ist daher immer im Kontext mit dem klinischen Erscheinungsbild zu sehen (Bhat et al. 2012, Nolte 2008, Mandell et al. 2007) und benötigt eine Interpretation der Ergebnisse durch erfahrene klinische Mikrobiologen oder Infektiologen.

Des Weiteren sollte die Studie noch einmal an unbehandelten Patienten durchgeführt werden um die Performanz des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen noch einmal ohne den Einfluss von Antibiotika zu bewerten. Immerhin ist es möglich, dass die Patienten aktuell infiziert waren und schon kalkuliert die korrekte Antibiose erhielten und somit kein Keimwachstum in der Kultur mehr möglich war. Allerdings darf es dadurch nicht zu einer Verzögerung des Therapiebeginns kommen, da das unethisch wäre. Es würde sich auch anbieten im Nachgang Proben die kulturpositiv waren noch einmal mit dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen zu testen und zu vergleichen. So ließe sich zeigen, ob der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototyp vitale Pathogen sicher nachweist.

Es ist allerdings bekannt, dass in der Mehrheit der Fälle die kalkulierte und leitliniengerechte Therapie bereits korrekt ist und nur selten die vorhandenen Erreger nicht erfasst (Marrie et al. 2000). Gerade aber in solchen Fällen wird von kulturunabhängigen, molekularbiologischen Verfahren ein besseres Endergebnis erwartet (van der Eerden et al. 2005), welches vom Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen bisher nicht nachweislich erreicht wird.

Es ist bekannt, dass eine Multiplex-PCR eine geringere Sensitivität hat als eine Singleplex-PCR (Bhat et al. 2012). Für die Weiterentwicklung des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen ist es daher nötig die einzelnen Reaktionen zu stabilisieren um die Interferenzen möglichst gering zu halten und falsche Ergebnisse zu minimieren. Letzteres trifft insbesondere für die Spezifität der Primer zur Detektion der Pneumokokken zu. Wobei noch nicht ausreichend geklärt ist für welchen PCR-Wert eine Infektion oder lediglich eine Kolonisation vorliegt.

Im Bezug auf die hohe Rate an falsch positiven *Streptococcus pneumoniae* Ergebnissen haben andere Studien gezeigt, dass man die Sensitivität und Spezifität deutlich steigern kann in dem man andere Gene verwendet, z.B. *lytA* oder *psaA*. Mit *lytA* konnte in einer real-time-PCR eine Sensitivität von 96,2% und eine Spezifität von 93,2% erzielt werden (Morozumi et al. 2006).

Ähnliche Ergebnisse konnten für *Haemophilus influenzae* erzielt werden, wenn man die 16S-rRNA als Analysetarget nutzt. Möglicherweise könnten diese Ansätze dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen zu mehr diagnostischer Sicherheit verhelfen.

In der klinischen Analyse ist aufgefallen, dass es nicht einfach ist eine Pneumonie zu diagnostizieren. Wie auch schon in anderen Studien konnte eine statistische Signifikanz für erhöhte Leukozytenwerte bei Pneumoniepatienten nachgewiesen werden (Musher et al. 2013).

Für das CRP gibt es Studien, in denen Richtwerte von > 40 mg/L für eine bakterielle Pneumonie angegeben werden. Jedoch scheint vor allem die Spezifität mit einer Spanne zwischen 65% und 90% großen Schwankungen zu unterliegen. Die Sensitivität ist mit ca. 70% dagegen relativ konstant (Holm et al. 2007, Flanders et al. 2004).

Auch wenn in der vorliegenden Studienpopulation keine Signifikanz für ein steigendes PCT festgestellt werden konnte, sollte daran festgehalten werden PCT in die Diagnostik einer Pneumonie mit einzubeziehen. Denn in Studien konnten bereits gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen einem PCT-Anstieg und der Schwere einer Pneumonie gibt und es eine höhere Sensitivität als das CRP hat (Boussekey et al. 2006, Masia et al. 2005).

Natürlich ist die Bestimmung des PCT kostenintensiver, aber wie nachfolgend beschrieben, sind diese Kosten gerechtfertigt.

In Studien konnte gezeigt werden, dass der Antibiotikabedarf erheblich reduziert werden kann, wenn man die Antibiotikagabe am PCT-Verlauf orientiert. So war es im Schnitt möglich mit einer Antibiotikatherapie von vier Tagen, anstatt acht, das gleiche Therapieergebnis beim Patienten zu erreichen (Schuetz et al. 2012). Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung, da die Resistenzlage sich stetig verändert und man mit einem reduzierten Einsatz von Antibiotika diese Veränderung positiv beeinflussen könnte.

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die Risikoordnung und Mortalitätsabschätzung bei Krankenhausaufnahme durch den PCT-Wert und den CRB-65-Score weit besser sind als durch CRP und Leukozytenwerte (Kruger et al. 2008).

Die fehlende Signifikanz des PCT-Anstiegs in der vorliegenden Arbeit kann zum einen bedingt sein durch die erschwerte Diagnosesicherung und somit falsche Gruppenzuordnung oder da viele Patienten der Studienpopulation multimorbide waren und meist die Pneumonie nicht im Vordergrund stand.

Es konnte nicht gezeigt werden, ob der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype zu einer Verbesserung des Patientenoutcomes führt, da aufgrund der fehlenden Resistenzanalysen kein

Therapiekonzept erstellt werden konnte und die Patienten weiter empirisch therapiert werden müssten. Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Mehrheit der aufgetretenen Pathogene im Erregerspektrum der Kartusche des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen enthalten sind. Für die Verwendung im Krankenhaus, wo die Proben meist von intensivpflichtigen Patienten stammen, wäre es trotzdem wünschenswert, dass die Palette mit Viren wie CMV oder Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* ergänzt werden, da gerade hier eine schnelle Therapie von Nöten wäre und somit eine weitere Diagnostik eingespart werden könnte und weniger Probenmaterial nötig ist. Für die Unterscheidung von Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* und MRSA sollte überlegt werden, ob sich ein anderer Genort als zielführender erweist, damit die Proben nicht noch einmal extra getestet werden muss.

Negativ zu verzeichnen ist die hohe Ausfallsrate der Kartuschen (31/302, 10%), des Systems (24/302, 8%) und die Teilausfälle (Einzelreaktion: 1225/3519, 35%). Insgesamt konnten nur etwa die Hälfte der Analysen durchgeführt werden (Gesamtausfall: 2160/5134, 42,1%). Bei dem oben genannten Preis ist der Ausfall ein nicht tragbarer ökonomischer Faktor. Die Proben werden nach einem anerkannten Verfahren gereinigt, so dass eine Störung der Reaktion durch Probenverunreinigungen unwahrscheinlich erscheinen. Es sollte überlegt werden, ob man das Kontrollgen direkt mit in den Lysepuffer oder den Testkit gibt, so dass es nicht fehlen kann. Eine weitere Möglichkeit für die häufigen Ausfälle könnte ein erhöhter DNA-Gehalt sein, der die PCR inhibiert. Falls das ein Problem war, sollte eine Prüfvorrichtung entwickelt werden, die solche Proben verdünnt.

Außerdem wird für die Analyse sehr viel Probenmaterial benötigt, was eine zusätzliche Belastung für den Patienten bedeutet. Wenn es zu häufigen Wiederholungsuntersuchungen kommt, ist vor allem die BAL ein Problem, da sie ein invasives Verfahren ist. Bevor der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype routinemäßig zum Einsatz kommt, sollte diese hohe Ausfallsquote deutlich gesenkt werden, da man sich im Alltag auf die Diagnostik verlassen muss und jede ausgefallene Probe einen erneuten Zeit- und Belastungsfaktor für das Patientenwohl und das Personal darstellt.

Die mittels Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype bestimmten Resistenzen konnten nicht verwendet oder ausgewertet werden, weil die Ausfallsquote zu hoch war und die Ergebnisse nicht immer plausibel waren. Dadurch ergibt sich ein weiteres Problem. Jede Probe müsste in der aktuellen Situation des Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen kulturell angezüchtet werden um später auf seine Resistenzlage getestet zu werden. Wie oben bereits beschrieben, ist das nicht immer möglich. In so einem Fall wüsste man zwar den

Erreger aber nicht dessen Antibiotikaresistenz für die Therapieentscheidung, was die Analyse zumindest in diesem Punkt als nutzlos erscheinen lässt. Für einen routinemäßigen Einsatz ist der Automat erst dann geeignet, wenn sowohl der Erregernachweis als auch seine Resistenzgenanalyse konstant funktionieren, da man sich vor allem bei schwer anzüchtbaren Keimen erhofft mit der kulturunabhängigen Methoden die Therapie des Patienten zu verbessern und schneller einzuleiten. Fraglich ist auch, ob die analysierten Genorte ausreichen, da es auch hier viele Unterschiede zwischen Ländern und Erregerstämmen gibt. Einzig zum Ausschluss einer Infektion scheint der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype aktuell geeignet, denn er überzeugt mit einer Gesamtspezifität von 96,54%. Dabei ist allerdings zu beachten, dass eine negative PCR grundsätzlich nie etwas ausschließen kann. Es stellt sich also die Frage, ob diese Aussage wirklich so viel Geld wert ist.

7 Schlussfolgerung

Mit dem Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen wurde ein sehr schneller molekularer Test für den kulturunabhängigen, molekularbiologischen Erregernachweis aus Atemwegsmaterialien entwickelt. Durch die schnelle Bearbeitung ließe sich die initiale Behandlung der Pneumonie deutlich verbessern. Man könnte gezielter therapieren und somit Antibiotika sparen und Resistenzen eindämmen.

Allerdings bedarf das Gerät noch erheblicher Verbesserungen im technischen Ablauf und vor allem in der Sensitivität einiger Pathogene, z.B. *Streptococcus pneumoniae*. Außerdem müssen noch einige Hard- und Softwarefehler behoben werden um die Praxistauglichkeit des Systems zu verbessern und die Ausfallrate massiv zu senken.

Der analysierte Prototyp ist für die Praxis nicht geeignet. Seine Ausfallraten sind zu hoch. Auch eine genaue Aussage über den Einfluss auf die Behandlung lässt sich nicht einschätzen, da viele Patienten bereits kalkuliert richtig antibiotisch behandelt waren und der Unyvero[®] Pneumonia Application Prototype aufgrund fehlender Resistenzanalysen häufig keine Aussage zur Therapie hätte geben können.

Im Rahmen der Entwicklung und Verbesserung sollte der Automat noch an unbehandelten Patienten mit Pneumonie getestet werden, sowie mit anderen kulturunabhängigen, mikrobiologischen Methoden verglichen werden. Das Erregerspektrum der Probenkartusche ist für die Mehrheit der Fälle ausreichend. Damit es sich für ein Krankenhaus lohnt die Kosten für den Unyvero[®] Pneumonia Application Prototypen aufzubringen und in den Alltag dauerhaft zu integrieren sollten Viren (z.B. CMV) und Pilzen (z.B. *Aspergillus spp.*) ergänzt werden.

Im Verlauf der klinischen Analyse der Patienten ist erneut aufgefallen, dass die Diagnose einer Pneumonie nicht einfach zu stellen ist. Es konnten jedoch Unterschiede für Leukozytenwerte, CRP und PCT zwischen Pneumoniepatienten und Patienten mit einer Infektion unbekannter Ursache festgestellt werden.

8 Literatur-/Quellenverzeichnis

- Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (2):836-839.
- Bartlett JG. 2011. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*, 52 Suppl 4:S296-304.
- Bartlett JG, Calderwood, B., Thorner, A. Diagnostic approach to community-acquired pneumonia in adults.
- Bauer M, Reinhart K. 2010. Molecular diagnostics of sepsis--where are we today? *Int J Med Microbiol*, 300 (6):411-413.
- Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T, Group CS. 2006. CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia. *J Intern Med*, 260 (1):93-101.
- Bauer TT, Welte T, Ernen C, Schlosser BM, Thate-Waschke I, de Zeeuw J, Schultze-Werninghaus G. 2005. Cost analyses of community-acquired pneumonia from the hospital perspective. *Chest*, 128 (4):2238-2246.
- Bennett PM. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1:S347-357.
- Bertini A, Giordano A, Varesi P, Villa L, Mancini C, Carattoli A. 2006. First report of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (6):2268-2269.
- Bhat N, O'Brien KL, Karron RA, Driscoll AJ, Murdoch DR, Pneumonia Methods Working G. 2012. Use and evaluation of molecular diagnostics for pneumonia etiology studies. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 2:S153-158.
- Boussekey N, Leroy O, Alfandari S, Devos P, Georges H, Guery B. 2006. Procalcitonin kinetics in the prognosis of severe community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med*, 32 (3):469-472.
- Braun J, Dalhoff, K. Pneumonie 2014 <http://pneumonie-aktuell.de/index.html>.
- Brockmann S. 2013.
- Brodt H.R. SW. 2012. Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung. Schattauer.

- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (3):969-976.
- Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, Ferchichi L, Walsh TR. 2012. First report of *mefA* and *msrA/msrB* multidrug efflux pumps associated with *bla*TEM-1 beta-lactamase in *Enterococcus faecalis*. *Int J Infect Dis*, 16 (2):e104-109.
- Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, Bergeron J, Retsema JA. 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*, 22 (5):867-879.
- Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Bauer T, von Baum H, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, Gatermann S, Gerlach H, Grabein B, Hoffken G, Kern WV, Kramme E, Lange C, Lorenz J, Mayer K, Nachtigall I, Pletz M, Rohde G, Rosseau S, Schaaf B, Schaumann R, Schreiter D, Schutte H, Seifert H, Sitter H, Spies C, Welte T. 2012. [Epidemiology, diagnosis and treatment of adult patients with nosocomial pneumonia. S-3 Guideline of the German Society for Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, the German Society for Infectious Diseases, the German Society for Hygiene and Microbiology, the German Respiratory Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy], *Pneumologie*, 66 (12):707-765.
- DESTATIS Todesursachen Sterbefälle insgesamt 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10.
- Dietel M SN, Zeitz M, Möckel M. 2013. *Harrison Innere Medizin*.
- DIN 2012, EN ISO 15189:2012 Medizinische Laboratorien - Anforderungen an die Qualität und Kompetenz.
- Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G. 2009. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax*, 64 (12):1062-1069.
- Flanders SA, Stein J, Shochat G, Sellers K, Holland M, Maselli J, Drew WL, Reingold AL, Gonzales R. 2004. Performance of a bedside C-reactive protein test in the diagnosis of community-acquired pneumonia in adults with acute cough. *Am J Med*, 116 (8):529-535.
- Fluit AC, Schmitz FJ. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect*, 10 (4):272-288.

- Geckler RW, McAllister CK, Gremillion DH, Ellenbogen C. 1985. Clinical value of paired sputum and transtracheal aspirates in the initial management of pneumonia. *Chest*, 87 (5):631-635.
- Gennis P, Gallagher J, Falvo C, Baker S, Than W. 1989. Clinical criteria for the detection of pneumonia in adults: guidelines for ordering chest roentgenograms in the emergency department. *J Emerg Med*, 7 (3):263-268.
- Gruyter Wd. 2007. de Gruyter.
- Han J, Wang Y, Sahin O, Shen Z, Guo B, Shen J, Zhang Q. 2012. A fluoroquinolone resistance associated mutation in *gyrA* Affects DNA supercoiling in *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2:21.
- Hoffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R, Sitter H, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für C, Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und B, Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk C. 2009. [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. *Pneumologie*, 63 (10):e1-68.
- Höffken G, Prof.Dr.med., Prof. Dr. med. J. Lorenz, Prof. Dr. med. W. Kern, Prof. Dr. med. T. Welte, PD Dr. med. T. Bauer, Prof. Dr. med. K. Dalhoff, Prof. Dr. med. S. Ewig, Prof. Dr. med. P. Gastmeier, Dr. med. B. Grabein, PD Dr. med. E. Halle, Dr. med. M. Kolditz, Prof. Dr. med. R. Marre, PD Dr. H. Sitter 2012. Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen (akute Bronchitis, akute Exazerbation einer chronischen Bronchitis, Influenza und andere respiratorische Virusinfektionen) sowie ambulant erworbener Pneumonie S3-Leitlinie: Tiefe Atemwegsinfektionen / Pneumonie.
- Holm A, Nexoe J, Bistrup LA, Pedersen SS, Obel N, Nielsen LP, Pedersen C. 2007. Aetiology and prediction of pneumonia in lower respiratory tract infection in primary care. *Br J Gen Pract*, 57 (540):547-554.
- Kräplin T. 2014.

- Kruger S, Ewig S, Marre R, Papassotiriou J, Richter K, von Baum H, Suttorp N, Welte T, Group CS. 2008. Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community-acquired pneumonia across all CRB-65 classes. *Eur Respir J*, 31 (2):349-355.
- Laakso S, Kirveskari J, Tissari P, Maki M. 2011. Evaluation of high-throughput PCR and microarray-based assay in conjunction with automated DNA extraction instruments for diagnosis of sepsis. *PLoS One*, 6 (11):e26655.
- Leclercq R, Courvalin P. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (7):1267-1272.
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG, Infectious Diseases Society of A, American Thoracic S. 2007. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*, 44 Suppl 2:S27-72.
- Marrie TJ, Lau CY, Wheeler SL, Wong CJ, Vandervoort MK, Feagan BG. 2000. A controlled trial of a critical pathway for treatment of community-acquired pneumonia. CAPITAL Study Investigators. Community-Acquired Pneumonia Intervention Trial Assessing Levofloxacin. *JAMA*, 283 (6):749-755.
- Masia M, Gutierrez F, Shum C, Padilla S, Navarro JC, Flores E, Hernandez I. 2005. Usefulness of procalcitonin levels in community-acquired pneumonia according to the patients outcome research team pneumonia severity index. *Chest*, 128 (4):2223-2229.
- Metlay JP, Fine MJ. 2003. Testing strategies in the initial management of patients with community-acquired pneumonia. *Ann Intern Med*, 138 (2):109-118.
- Metlay JP, Kapoor WN, Fine MJ. 1997. Does this patient have community-acquired pneumonia? Diagnosing pneumonia by history and physical examination. *JAMA*, 278 (17):1440-1445.
- Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, Chiba N, Tajima T, Ubukata K. 2006. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol*, 44 (4):1440-1446.
- Musher D, Roig I, Charles G, Stager C, Logan N, Safar H. 2013. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: Results of a one-year study. *J Infect*.

- Nolte FS. 2008. Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*, 47 Suppl 3:S123-126.
- Oosterheert JJ, van Loon AM, Schuurman R, Hoepelman AI, Hak E, Thijsen S, Nossent G, Schneider MM, Hustinx WM, Bonten MJ. 2005. Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection. *Clin Infect Dis*, 41 (10):1438-1444.
- Perez-Perez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 40 (6):2153-2162.
- Pletz MW, Ewig S, Lange C, Welte T, Hoffken G. 2012. [Update pneumonia 2012]. *Dtsch Med Wochenschr*, 137 (44):2265-2280; quiz 2281-2284.
- Podbielski A, Herrmann, M., Kniehl, E., Mauch, H., Rüssmann, H. 2010. MiQ mikrobiologische-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) Urban&Fischer.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20 (3):440-458, table of contents.
- Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Buchler AC, Dollenmaier G, Speck RF, Bottger EC. 2011. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 53 (12):1245-1251.
- Rello J. 2008. Demographics, guidelines, and clinical experience in severe community-acquired pneumonia. *Crit Care*, 12 Suppl 6:S2.
- Ruß A. ES. 2011. Arzneimittelpocket plus 2012.
- Saupe A. 2011a. Diagnostik von Infektionen der tiefen Atemwege Trachealsekret/Bronchialsekret.
- Saupe A. 2011b. Diagnostik von Infektionen der tiefen Atemwege Sputum.
- Saupe A. 2011c. Diagnostik von Infektionen der tiefen Atemwege bronchoalveoläre Lavage.
- Schack M, Sachse S, Rodel J, Frangoulidis D, Pletz MW, Rohde GU, Straube E, Boden K. 2013. *Coxiella burnetii* (Q fever) as a cause of community-acquired pneumonia during the warm season in Germany. *Epidemiol Infect*:1-6.
- Schnoor M, Hedicke J, Dalhoff K, Raspe H, Schafer T, group Cs. 2007. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. *J Infect*, 55 (3):233-239.
















- Schuetz P, Muller B, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, Luyt CE, Wolff M, Chastre J, Tubach F, Kristoffersen KB, Burkhardt O, Welte T, Schroeder S, Nobre V, Wei L, Bhatnagar N, Bucher HC, Briel M. 2012. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*, 9:CD007498.
- Signe J, Jung B, Nougaret S, Belafia F, Panaro F, Bismuth M, Jaber S. 2012. Pneumonia in immunocompromised patients: more than meets the eye. *Am J Respir Crit Care Med*, 186 (11):e18.
- STIKO Epidemiologisches Bulletin Nr.34.
- Taut H. 2012. Rechnungen für mikrobiologische Anzucht am UKJ.
- Thews A. 2012.
- Torres A, Ferrer M, Badia JR. 2010. Treatment guidelines and outcomes of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*, 51 Suppl 1:S48-53.
- Ubukata K, Nonoguchi R, Matsushashi M, Konno M. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol*, 171 (5):2882-2885.
- v. Wulffen W. 2004. Der Einfluss der Protease Elastase auf das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten uropathogener *Escherichia coli* [Dissertation].
- van der Eerden MM, Vlaspoeder F, de Graaff CS, Groot T, Bronsveld W, Jansen HM, Boersma WG. 2005. Comparison between pathogen directed antibiotic treatment and empirical broad spectrum antibiotic treatment in patients with community acquired pneumonia: a prospective randomised study. *Thorax*, 60 (8):672-678.
- Wellinghausen N, Straube E, Freidank H, von Baum H, Marre R, Essig A. 2006. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *Int J Med Microbiol*, 296 (7):485-491.
- Welte T, Kohnlein T. 2009. Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med*, 30 (2):127-135.
- Welte T, Marre R, Suttorp N, Kompetenznetzwerk "Ambulant Erworbene P. 2006. [What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?]. *Med Klin (Munich)*, 101 (4):313-320.
- Woodhead M. 1998. Community-acquired pneumonia guidelines--an international comparison: a view from Europe. *Chest*, 113 (3 Suppl):183S-187S.

Test ID:	
Test Date:	
Cartridge-ID:	
Start User:	Finish User:
Comment:	
Microorganism Results	
Gram positive	Streptococcus pneumoniae 520
	Staphylococcus aureus 116
Non-fermentive bacteria	Pseudomonas aeruginosa 0
	Acinetobacter baumannii 0
	Legionella pneumophila 0
	Moraxella catarrhalis 0
	Sterodontomonas mallophila 0
Enterobacteriaceae	Enterobacter sp. 0
	Escherichia coli 0
	Klebsiella pneumoniae 0
	Klebsiella oxytoca 0
	Morganella morganii 0
	Proteus sp. 0
	Serratia marcescens 0
Other/Atypical	Haemophilus influenzae 0
	Chlamydophilia pneumoniae 0
	Pneumocystis jirovecii 0

62

Resistance marker Results

Resistance Gene

	tem	Enterobacteriaceae, Non-ferm. bacteria, Haemophilus influenzae
	shv	Enterobacteriaceae, Non-ferm. bacteria
	cpx-M	Enterobacteriaceae, Non-ferm. bacteria
	dha	Enterobacteriaceae
	ebc	Enterobacteriaceae
	kpc	Enterobacteriaceae, Non-ferm. bacteria
	oxa11	Acinetobacter baumannii
	mecA	Staphylococcus sp.
	mecA	Staphylococcus sp.
	ermA	Staphylococcus sp.
	ermC	Staphylococcus sp.
	mecA	Streptococcus sp.
	ermB	Streptococcus sp.
	int1	Enterobacteriaceae, Non-ferm. bacteria
	sul1	Enterobacteriaceae, Non-ferm. bacteria

Wildtype Gene








	gyrA83_Ecoli	Escherichia coli
	gyrA87_Ecoli	Escherichia coli
	gyrA83_2_Pseu	Pseudomonas aeruginosa
	gyrA83_3_Pseu	Pseudomonas aeruginosa
	gyrA87_2_Pseu	Pseudomonas aeruginosa
	gyrA87_3_Pseu	Pseudomonas aeruginosa
	parC_Pseu	Pseudomonas aeruginosa

Abb. 4: Resistenzanalyse

9.1 Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bedanken bei

- Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube für die Möglichkeit dieser Doktorarbeit und seine fachliche Unterstützung,
- Herrn Dr. med. P. Keller und Herrn Dr. med. M. Karrasch, die mich umfangreich betreut haben und mir immer mit gutem Rat und Kritik zur Stelle waren,
- Frau Taut für Ihre Hilfe bei organisatorischen Fragen oder Problemen bei der Kontaktaufnahmen innerhalb UKJ,
- Frau Dr. med. J. Peiselt für die zweite Begutachtung der Röntgenbefunde,
- Der Curetis AG für die Erlaubnis über ihr Produkt zu promovieren,
- Frau Dr. - Ing., M Sc. Epidemiology H. Hoyer für Ihre freundliche und umfangreiche Beratung,
- meinen Freund und meinen Eltern, die mir über die ganze Zeit eine wichtige Stütze waren.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Stephanie Juretzek, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzen Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und der Auswertung der Materialien so wie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. habil. Eberhard Straube, Herr Dr. med. Peter Keller, Herr Dr. med. Matthias Karrasch,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 01.07. 2014

Stephanie Juretzek